



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos

Evaluación del extracto del fruto de mullak'a (*Muehlenbeckia volcanica (Benth.) Endl.*) sobre las características de calidad de la carne molida de alpaca (*Vicugna pacos*) en refrigeración

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Ciencia y
Tecnología de los Alimentos

AUTORES

Maria Alessandra AROSENA CHAO

Ruth Hilaria CHAVEZ CERNA

ASESORES

Eliana Gabriela CONTRERAS LÓPEZ

Ana María MUÑOZ JÁUREGUI

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Arosena M., Chavez R. Evaluación del extracto del fruto de mullak'a (*Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl.) sobre las características de calidad de la carne molida de alpaca (*Vicugna pacos*) en refrigeración [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Ciencias de los Alimentos; 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Evaluación del extracto del fruto de mullak'a (*Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl.) sobre las características de calidad de la carne molida de alpaca (*Vicugna pacos*) en refrigeración"

Que presentan las Bachilleres en Ciencia y Tecnología de los Alimentos:


**MARIA ALESSANDRA AROSENA CHAO Y
RUTH HILARIA CHAVEZ CERNA**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:


DIECIOCHO (18) - SOBRESALIENTE

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Título Profesional de Licenciado (a) en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 22 de octubre de 2018


Mg. Norma Carlos Casas
Presidente


Q.F. Benedicta Carmen López Flores
Miembro


Q.F. Luz Fabiola Guadalupe Sifuentes de Posadas
Miembro


Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

DEDICATORIA

A Dios por bendecirme siempre desde lo alto, dándome la fortaleza necesaria para seguir adelante, ya que sin él la realización de esta tesis no hubiera sido posible.

A mis padres José Arosena y Ana Chao, y a mi hermano Luis Arosena por ser un apoyo constante en este camino y por todo su amor.

A mis abuelitos José Antonio Chao, Sabino Arosena y Maria Vidal que desde el cielo me guían y cuidan en todo momento; y porque sé que comparten conmigo todos los momentos de mi vida.

A mi linda abuelita Esther Gonzales, a mis queridos tíos y primos por su confianza depositada en mí y por su gran cariño en todo momento.

A mi compañera de tesis Ruth Chavez por su amistad incondicional y por depositar su confianza en mí para realizar juntas esta tesis.

A mis compañeros de la escuela de Ciencia de los Alimentos que me apoyaron cuando los necesitaba, dándome ánimos, en especial a mis queridas amigas Erika Chaina, Sofía Huamán y Nathaly Rodríguez.

Alessandra Arosena

A Dios porque en su misericordia me da la oportunidad de vivir y sentir su fortaleza en cada paso de mi vida, porque gracias a él que fue posible iniciar y culminar esta etapa profesional.

A mi madre Hilaria Cerna, por ser mi motivación para seguir adelante, desde aquel lugar del cielo.

A mi padre Filomon Chavez, mis hermanos, Miguel y Roller, por su constante apoyo y compañía.

A Bertha Auris, y Juana Benavides, que en reflejo de su amor incondicional, actúan con corazón de madre en todo momento.

A mí mejor Amiga Alessandra Arosena, por su comprensión, y confianza desde siempre.

A mi hermana Rebeca Auris, por sus palabras de ánimo, y cálida acogida.

A mis amigos de la congregación Vida Abundante, porque en sus valiosos mensajes contribuyen a seguir formando en mí una persona con valores y principios en el amor de Dios.

Ruth Chavez

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarnos las fuerzas necesarias para culminar este trabajo y por poner en nuestro camino a personas muy valiosas que han sido de gran ayuda en este camino.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, nuestra alma máter, a los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y de la Escuela de Ciencia de los alimentos.

A nuestra asesora de tesis, Ing. Eliana Gabriela Contreras López, por su valiosa asesoría, orientación y consejos oportunos que permitieron hacer realidad esta tesis. Gracias por la confianza ofrecida desde el primer instante y por estar siempre a nuestro lado guiándonos.

A nuestra co-asesora, la Dra. Ana María Muñoz Jáuregui, por el apoyo incondicional y sus valiosos aportes, que fueron puntos claves durante todo el desarrollo de nuestra tesis.

A la Dra Bettit Karim Salvá Ruiz, por todo el apoyo y conocimiento brindado.

A todos los docentes que nos abrieron las puertas de los laboratorios y nos acogieron con mucho cariño.

A nuestras familias y amistades por el apoyo constante en todo momento y por sus palabras de aliento.

A la Dra. Norma Carlos presidente del jurado y a los miembros del Jurado Examinador y Calificador, por las correcciones y aportes brindados.

Este trabajo de investigación fue financiado con el apoyo del Fondo de Promoción de trabajo de Tesis de Pregrado 2017 del Vicerrectorado de Investigación-UNMSM (Código N° A17040374b), gracias por el apoyo.

INDICE

ÍNDICE DE TABLAS	1
INDICE DE FIGURAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Objetivos	9
1.1.1 Objetivo General	9
1.1.2 Objetivos Específicos	9
1.2 Hipótesis	9
II. GENERALIDADES	10
2.1 Antecedentes generales de la especie mullak'a	10
2.2 Antecedentes generales de la especie alpaca	14
2.3 Radicales libres	19
2.4 Factores para la producción de radicales libres	20
2.5 Antioxidantes	23
2.6 Polifenoles	25
2.7 Butilhidroxitolueno (BHT)	33
2.8 Uso de antioxidantes en carnes	37
2.9 Efecto de la oxidación sobre la calidad de la carne	37
2.10 Cuantificación de fenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C)	38
2.11 Determinación de la actividad antioxidante	39
2.12 Evaluación Sensorial en Carnes	41
III. PARTE EXPERIMENTAL	42
3.1 Lugar de ejecución	42
3.2 Materiales, equipos, reactivos y soluciones	42
3.3 Métodos	44
3.3.1 Recolección de la muestra	44
3.3.2 Caracterización física del fruto	44

3.3.3 Caracterización Fisicoquímica del fruto.....	44
3.3.3.1 Humedad.....	44
3.3.3.2 Proteínas.....	44
3.3.3.3 Carbohidratos.....	45
3.3.3.4 Grasa	45
3.3.3.5 Cenizas	45
3.3.3.6 Vitamina C.....	45
3.3.3.7 Calcio, Hierro y Potasio	46
3.3.3.8 Grados Brix	46
3.3.3.9 pH	46
3.3.3.10 Acidez	46
3.3.4 Obtención del Extracto Natural	47
3.3.5 Caracterización fitoquímica del extracto del fruto de mullak'a	47
3.3.5.1 Alcaloides.....	47
3.3.5.2 Taninos	47
3.3.5.3 Flavonoides.....	47
3.3.5.4 Azúcares Reductores	47
3.3.5.5 Saponinas	48
3.3.5.6 Antocianinas.....	48
3.3.6 Determinación de Polifenoles Totales	48
3.3.7 Determinación de actividad antioxidante	49
3.3.7.1 Metodología desarrollada para el ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH).....	49
3.3.7.2 Metodología desarrollada para el ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)	51
3.3.8 Evaluación de parámetros de calidad de la carne de alpaca.....	53
3.3.9 Acondicionamiento de la carne de alpaca para cada tratamiento.....	55
3.3.10 Formación del panel sensorial	56
3.3.11 Análisis Microbiológico:.....	61
3.3.12 Determinación instrumental del color	62

IV. RESULTADOS	63
4.1 Características Físicas de fruto:	63
4.2 Composición proximal	63
4.3 Caracterización Fisicoquímica.....	64
4.4 Determinación de Polifenoles Totales	65
4.5 Determinación de actividad antioxidante mediante la metodología DPPH.....	66
4.6 Determinación de actividad antioxidante mediante la metodología ABTS.....	67
4.7 Calculo del IC ₅₀ para las muestras de trolox, BHT y extracto de mullak'a utilizando las metodologías DPPH y ABTS.	69
4.8 Determinación de actividad antioxidante del fruto de mullak'a mediante el método DPPH	69
4.9 Determinación de actividad antioxidante del fruto de mullak'a mediante el método ABTS.....	70
4.10 Evaluación de parámetros de calidad del corte bife ancho de alpaca.....	70
4.11 Evaluación sensorial.....	71
4.12 Análisis Microbiológico	82
4.13 Determinación del pH	83
4.14 Determinación instrumental del color.....	84
V. DISCUSIONES.....	87
VI. CONCLUSIONES.....	96
VII. RECOMENDACIONES.....	97
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	98
IX. ANEXOS	110

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA Nº 1:	Caracterización fisicoquímica del fruto de <i>Muehlenbeckia volcanica</i>	13
TABLA Nº 2:	Producción de carne de alpacas y llamas en Perú (expresado en toneladas métricas)	16
TABLA Nº 3:	Composición química del musculo <i>Longissimus thoracis y lumborum</i> de alpacas y llamas.	17
TABLA Nº 4:	Criterios microbiológicos para la carne molida según “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano”	18
TABLA Nº 5:	Mecanismos de acción de algunos antioxidantes	24
TABLA Nº 6:	Ejemplo de polifenoles y su actividad biológica frente a diferentes líneas tumorales y en modelos animales.	26
TABLA Nº 7:	Mezclas utilizadas para el método DPPH	50
TABLA Nº 8:	Mezclas utilizadas para el método ABTS	52
TABLA Nº 9:	Diámetro y peso del fruto de mullak’a	63
TABLA Nº 10:	Composición proximal del fruto de <i>Muehlenbeckia volcanica</i>	63
TABLA Nº 11:	Determinación de pH, acidez y grados Brix del fruto de Mullak’a	64
TABLA Nº 12:	Caracterización fitoquímica del extracto del fruto de mullak’a	64
TABLA Nº 13:	Absorbancias en relación a la concentración de ácido gálico	65
TABLA Nº 14:	Concentración de ácido gálico en relación a la concentración de fruto y extracto de mullak’a	65
TABLA Nº 15:	Porcentaje de inhibición en relación a la concentración de trolox mediante el reactivo DPPH	66
TABLA Nº 16:	Porcentaje de inhibición en relación a la concentración de BHT mediante el reactivo DPPH	66
TABLA Nº 17:	Porcentaje de inhibición en relación a la concentración de extracto de mullak’a mediante el reactivo DPPH	67
TABLA Nº 18:	Porcentaje de inhibición en relación a la concentración de trolox mediante el reactivo ABTS	67
TABLA Nº 19:	Porcentaje de inhibición en relación a la concentración de BHT mediante el reactivo ABTS	68
TABLA Nº 20:	Porcentaje de inhibición en relación a la concentración del extracto de mullak’a mediante el reactivo ABTS	68
TABLA Nº 21:	Comparación de los IC ₅₀ entre las metodologías DPPH y ABTS	69

TABLA Nº 22:	Concentración de trolox en relación a la concentración de fruto mediante el reactivo DPPH	69
TABLA Nº 23:	Concentración de trolox en relación a la concentración de fruto mediante el reactivo ABTS	70
TABLA Nº 24:	Resultados de los parámetros de calidad del corte bife ancho de alpaca	71
TABLA Nº 25:	Lista de candidatos preseleccionados	72
TABLA Nº 26:	Resultado de la prueba de consistencia	76
TABLA Nº 27:	Análisis de Varianza en la prueba de consistencia	77
TABLA Nº 28:	Efecto del tipo de Tratamiento y del tiempo de almacenamiento sobre los atributos sensoriales de la carne de alpaca	79
TABLA Nº 29:	Resultado del recuento de bacterias mesófitas aerobias (BMA) Log_{10} UFC/g de muestra	83
TABLA Nº 30:	Efecto del tipo de Tratamiento y del tiempo de almacenamiento sobre el pH de la carne de Alpaca	84
TABLA Nº 31:	Efecto del tipo de Tratamiento y del tiempo de almacenamiento sobre los parámetros de color de la carne de Alpaca	86
TABLA Nº 32:	Parámetros de color C^* y H^* de la carne de alpaca control, con BHT y con el extracto del fruto de mullak'a en almacenamiento refrigerado	87
TABLA Nº 33:	Diferencia de color Euclídea (ΔE) entre el día 1 y día 12 de almacenamiento refrigerado de la carne de alpaca control, con BHT y con el extracto del fruto de mullak'a	87

INDICE DE FIGURAS

FIGURA Nº 1:	Planta de mullak'a	10
FIGURA Nº 2:	Flor de mullak'a	10
FIGURA Nº 3:	Fruto mullak'a	11
FIGURA Nº 4:	Distribución geográfica de <i>Muehlenbeckia volcanica</i>	12
FIGURA Nº 5:	Distribución geográfica poblacional de alpacas en los departamentos del Perú	15
FIGURA Nº 6:	Formación de radicales libres	19
FIGURA Nº 7:	Reacciones involucradas en la auto-oxidación de lípidos	21
FIGURA Nº 8:	Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles en las plantas CoA=Coenzima A.	29
FIGURA Nº 9:	Principales clases de flavonoides	30
FIGURA Nº 10:	Principales clases de polifenoles	31
FIGURA Nº 11:	Reacciones HAT	32
FIGURA Nº 12:	Reacciones SET	32
FIGURA Nº 13:	Estructura química del BHT.	33
FIGURA Nº 14:	Híbridos con resonancia estable de derivados de antioxidante fenólicos	35
FIGURA Nº 15:	Mecanismo de reacción de los antioxidantes primarios	36
FIGURA Nº 16:	Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de Folin- Ciocalteu	38
FIGURA Nº 17:	Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante	39
FIGURA Nº 18:	Estructura del ABTS ^{•+} antes y después de la reacción con el antioxidante	40
FIGURA Nº 19:	Escala no estructurada de 10cm utilizada para la evaluación del aspecto general	59
FIGURA Nº 20:	Escala no estructurada de 10cm utilizada para la evaluación del color.	59
FIGURA Nº 21:	Escala no estructurada de 10cm utilizada para la evaluación de la consistencia	60
FIGURA Nº 22:	Escala no estructurada de 10cm utilizada para la evaluación del olor	60
FIGURA Nº 23:	Puntuación del aspecto general de las tres muestras, en cada uno de los cuatro tiempos	81
FIGURA Nº 24:	Puntuación del atributo color de las tres muestras, en cada uno de los cuatro tiempos	81
FIGURA Nº 25:	Puntuación del atributo consistencia de las tres muestras, en cada uno de los cuatro tiempos	82
FIGURA Nº 26:	Puntuación del atributo olor de las tres muestras, en cada uno de los cuatro tiempos.	82

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar el extracto del fruto de mullak'a (*Muehlenbeckia volcanica* (Benth) Endl) sobre las características físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales de carne molida de alpaca en refrigeración. Se evaluó el contenido de polifenoles totales por el método Follin-Ciocalteu obteniendo valores para el fruto de 463 ± 0.05 mg de ácido gálico por 100 g de fruto y para el extracto de $5\,722 \pm 0.91$ mg por 100 g de extracto de mullak'a, la actividad antioxidante in vitro del fruto se cuantificó mediante el método DPPH obteniendo 17.7 ± 0.61 µg de trolox por mg de fruto de mullak'a y mediante el método ABTS se obtuvo 12.3 ± 0.07 µg de trolox por mg de fruto de mullak'a; además se evaluó el valor IC₅₀ para el extracto de mullak'a obteniendo los valores de 52.7 µg/ml y 18.1 µg/ml por los métodos DPPH y ABTS respectivamente.

La industria cárnica utiliza diferentes antioxidantes sintéticos dado que los productos cárnicos son altamente susceptibles a reacciones oxidativas que promueven cambios en sus características organolépticas. Sin embargo, ante los prejuicios y la preocupación sobre los posibles efectos perjudiciales a la salud de los consumidores, la tendencia actual es reemplazar los aditivos sintéticos por extractos naturales provenientes de frutos que contengan compuestos con actividad antioxidante, por tanto se analizaron tres tratamientos diferentes, uno con extracto del fruto de mullak'a (antioxidante natural) a una concentración comparable con la actividad antioxidante del BHT, un segundo tratamiento con BHT (antioxidante sintético) y un tercer tratamiento control, para determinar la cantidad requerida para evaluar los parámetros fisicoquímicos y sensoriales de carne molida de alpaca almacenada a 2 °C durante 12 días, se calculó el valor IC₅₀ para el BHT mediante los métodos de DPPH y ABTS obteniendo 11.7 µg/ml y 2.1 µg/ml respectivamente. Se evaluó la estabilidad a través de las propiedades fisicoquímicas: pH, color (parámetros CIELab), microbiológico (recuento de microorganismos totales viables aerobios mesófilos) y análisis sensorial (aspecto general, olor, color y consistencia) utilizando escalas no estructuradas de 10 cm. El pH de la carne de alpaca del tratamiento con extracto del fruto de mullak'a se mantuvo dentro del rango aceptable durante los doce días de almacenamiento a diferencia de los otros tratamientos ($p < 0.05$). En los atributos aspecto general y color, el tratamiento con BHT presenta mayor estabilidad en comparación a los otros tratamientos; mientras que, para los atributos de consistencia y olor, el tratamiento con extracto del fruto de mullak'a es el que presenta mayor estabilidad ($p < 0.05$). La diferencia de color Euclídea (ΔE) calculada a con los parámetros de color L* a* b* nos indica que el color se mantuvo estable en las muestras con tratamiento de extracto del fruto de mullak'a hasta el día seis de almacenamiento a diferencia de los otros tratamientos ($p < 0.05$). El tratamiento con extracto del fruto de mullak'a presentó recuentos similares al control, siendo el tratamiento con BHT el que presenta mayores recuentos con respecto a los otros dos tratamientos ($p < 0.05$). Se concluye que la muestra de carne molida de alpaca que contiene el extracto del fruto de mullak'a a la concentración de 862 mg de extracto del fruto de mullak'a por kg carne, otorgó estabilidad en el parámetro de pH, color CIELab y en los atributos sensoriales de consistencia y olor, en las condiciones probadas; por lo que se recomienda su uso como antioxidante natural en la carne molida de alpaca.

Palabras clave: *Muehlenbeckia volcanica*, *Vicugna pacos*, DPPH, ABTS, antioxidante natural, análisis sensorial.

ABSTRACT

The present study had as main objective to evaluate the extract of the fruit of mullak'a (*Muehlenbeckia volcanica* (Benth) Endl) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of ground meat of alpaca in refrigeration. The content of total polyphenols was evaluated by the Follin-Ciocalteu method obtaining values for the fruit of 463 ± 0.05 mg of gallic acid per 100 g of fruit and for the extract of $5\,722 \pm 0.91$ mg per 100 g of mullak'a extract, the antioxidant activity in vitro of the fruit was quantified by means of the DPPH method obtaining 17.7 ± 0.61 μ g of trolox per mg of mullak'a fruit and by means of the ABTS method 12.3 ± 0.07 μ g of trolox per mg of mullak'a fruit was obtained; in addition the IC₅₀ value for the mullak'a extract was evaluated obtaining the values of 52.7 μ g/ml and 18.1 μ g/ml by the DPPH and ABTS methods respectively. The meat industry uses different synthetic antioxidants since meat products are highly susceptible to oxidative reactions that promote changes in their organoleptic characteristics. However, in view of the prejudices and concerns about possible harmful effects on the health of consumers, the current trend is to replace synthetic additives with natural extracts from fruits that contain compounds with antioxidant activity, therefore three different treatments were analyzed, one with extract from the fruit of mullak'a (natural antioxidant) at a concentration comparable to the antioxidant activity of BHT, a second treatment with BHT (synthetic antioxidant) and a third control treatment, to determine the quantity required to evaluate the physicochemical and sensory parameters of ground alpaca meat stored at 2 °C for 12 days, the IC₅₀ value for BHT was calculated using the DPPH and ABTS methods obtaining 11.7 μ g/ml and 2.1 μ g/ml respectively. Stability was evaluated through physicochemical properties: pH, color (CIELab parameters), microbiological (total viable aerobic mesophilic microorganism count) and sensory analysis (general appearance, odor, color and consistency) using unstructured scales of 10 cm. The pH of alpaca meat treated with mullak'a fruit extract remained within the acceptable range during the twelve days of storage as opposed to the other treatments ($p < 0.05$). In the attributes general aspect and color, the treatment with BHT presents greater stability in comparison to the other treatments; whereas for the attributes of consistency and odor, the treatment with extract of the fruit of mullak'a is the one that presents greater stability ($p < 0.05$). The color parameters L* a* b* by calculating the Euclidean color difference (ΔE) indicate that the color remained stable in the samples with mullak'a fruit extract treatment until day six of storage unlike the other treatments ($p < 0.05$). The treatment with mullak'a fruit extract presented similar counts to the control, being the treatment with BHT the one that presents higher counts with respect to the other two treatments ($p < 0.05$). It is concluded that the sample of ground alpaca meat containing mullak'a fruit extract at a concentration of 868 mg of mullak'a fruit extract per kg of meat, gave stability in the pH parameter, CIELab color and sensory attributes of consistency and odor, in the conditions tested, so it is recommended its use as a natural antioxidant in ground alpaca meat.

Key words: *Muehlenbeckia volcanica*, *Vicugna pacos*, DPPH, ABTS, natural antioxidant, sensory analysis.

I. INTRODUCCIÓN

La mullak'a (*Muehlenbeckia volcanica* (Benth) Endlicher) es un arbusto silvestre que contiene taninos, saponinas, rutina, emodina, ácido crisofánico glucósidos, antraquinónicos, ceras, resinas, lectinas, gomas, almidones, celulosa, flavonoides prenilados y fenoles.¹ Teves, F y Torres, R estudiaron la actividad antioxidante in vitro de extractos antociánicos del fruto de mullak'a e identificaron la cianidina como la antocianidina presente, además de hallar el IC₅₀ del extracto del fruto de mullak'a mediante los métodos DPPH y ABTS obteniendo resultados menores en comparación a los de otros frutos estudiados.²

La alpaca (*Vicugna pacos*) es uno de los camélidos sudamericanos domesticados, es criada para el aprovechamiento de su fibra y carne, representando un importante recurso cárnico y económico para pequeños productores, asentados en las comunidades y parcialidades campesinas de las zonas altas de la sierra sur y central del Perú.³ La carne es el tejido animal más apropiado para ser usado como alimento, proporciona proteínas de alta calidad, minerales, vitaminas y muchos otros micronutrientes. Sin embargo, a pesar de los beneficios nutricionales, el consumo de carne roja se ha relacionado con enfermedades coronarias y varios tipos de cáncer. En octubre de 2015, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (siglas en inglés IARC) en el marco de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una monografía clasificando a las carnes procesadas como carcinógenas (Grupo I) y las carnes rojas como probablemente carcinógenas (Grupo 2A), por tanto, recientemente se busca el desarrollo de estrategias innovadoras en procesamiento y el uso de ingredientes naturales para minimizar el problema de salud, mejorar las cualidades organolépticas, nutricionales, seguridad alimentaria y el periodo de vida de anaquel de la carne y/o productos cárnicos.⁴

Los atributos de calidad de la carne y productos cárnicos se deterioran debido a la oxidación de los lípidos durante el procesamiento y almacenamiento. La oxidación de los lípidos es responsable del desarrollo de productos de oxidación primaria y secundaria, reducción de la calidad nutricional, así como cambios en el sabor, que pueden precipitar en riesgos para la salud y pérdidas económicas en términos de calidad.⁵

Los avances en la investigación han permitido a los científicos pensar la posibilidad de mitigar los problemas de oxidación de los lípidos en los productos cárnicos a través de diferentes estrategias.⁴ La tendencia actual se ha desplazado hacia el uso de antioxidantes naturales derivados de diversas plantas, materiales que son ricos en compuestos fenólicos con capacidad de romper las reacciones en cadena de los radicales libres mediante la donación de hidrógeno y electrones; mientras que los antioxidantes sintéticos, como el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT), el galato de propilo (PG) y la butilhidroquinona terciaria (TBHQ) utilizados durante mucho tiempo para inhibir los cambios inducidos por la oxidación en la carne, están bajo observación debido a los potenciales efectos genotóxicos.⁴ Además, los antioxidantes naturales reducen la probabilidad de formación de toxinas cuando se aplican altas temperaturas,⁴ y cuando se usan en la formulación del producto también podrían aumentar el potencial antioxidante existente incluso si la carne no se somete a un procesamiento extensivo, promueven importantes impactos en sabor, color, olor, textura, valor nutritivo y en la aceptabilidad del consumidor.^{6,7,8} Por lo tanto, los antioxidantes naturales tienen un mayor potencial de aplicación debido a la aceptabilidad de los consumidores sobre los antioxidantes sintéticos.

Karre *et al.* analizaron los efectos de varios zumos de frutas y extractos de plantas en la carne y aves de corral concluyendo que estos ingredientes pueden afectar la calidad del producto y, en última instancia la aceptabilidad del consumidor. Los extractos de ciruela, semilla de uva, corteza de pino y romero causaron cambios en el color cuando se usa en algunos productos cárnicos o avícolas; los consumidores pueden percibir estos cambios como negativos; debido a que el extracto de semilla de uva aumenta el enrojecimiento del producto y puede ser percibido como poco cocido.

Además, los extractos afectan el sabor de la carne tratada y productos avícolas, dependiendo del producto, estos los sabores pueden verse como negativos o como positivos.⁹

El-Nashi *et al.* estudiaron el efecto de las cáscaras de granada en polvo para mantener las características de calidad de salchichas de ternera durante el almacenamiento refrigerado a $4^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 12 días concluyendo que el uso de cáscaras de granada en polvo a concentraciones de 1%, 2% y 3% es útil para lograr una alta estabilidad de los criterios de calidad (WHC, plasticidad, pH, TBA, TVN y recuentos bacterianos totales, levadura y moho, bacterias formadoras de esporas y coliformes) de la salchicha de ternera sin ningún efecto negativo sobre las características sensoriales del producto.¹⁰

Fernandes *et al.*¹¹ analizaron los efectos de un extracto de orégano añadido a hamburguesas de ovejas envasadas en atmósfera modificada concluyendo que la adición de extracto de orégano mostró un efecto antioxidante en hamburguesas de oveja empacadas en MAP y almacenadas a 2 ± 1 ° C, reduciendo la oxidación de lípidos y proteínas, y mantener la estabilidad sensorial hasta límite de 15 días, compatible con BHT, aunque la vida útil de ambos los tratamientos se han limitado microbiológicamente a 10 días.

Serhat *et al.* evaluaron el efecto del extracto de cáscara de granada para retrasar la oxidación de lípidos en albóndigas de carne de vacuno durante el almacenamiento refrigerado, donde la adición de 0,5 y 1% de extracto de cáscara de granada en las albóndigas redujo la oxidación de lípidos y proteínas y mejoró las puntuaciones sensoriales.¹²

Selani *et al.* investigaron con extractos de residuos de la industria vinícola como antioxidantes naturales en la carne de pollo cruda y cocida durante el almacenamiento congelado, en el que tuvo como resultados que el pH de las muestras crudas y cocidas no se vieron afectados por la adición de extractos de uva. Sin embargo, estos extractos fueron eficaces para inhibir la oxidación lipídica de la carne de pollo cruda y cocida, con resultados comparables a los antioxidantes sintéticos.¹²

Así mismo estudios de efectos antioxidantes asociados a extractos naturales sobre muestras de carne de alpaca son incipientes, sin embargo por tratarse de un animal con altos niveles nutricionales siendo el Perú el productor número uno a nivel nacional y latinoamericano, nace el interés por su revaloración y optimización como fuente alimentaria, a su vez el fruto no reporta investigaciones previas destinadas a su aplicación como antioxidante natural en una matriz alimentaria, no obstante base de datos afirman que el extracto del fruto si presenta actividad antioxidante in vitro.² Sin embargo, la aplicación de extractos de plantas, hierbas, especias, zumos de fruta, cascara de fruta y aceites esenciales con efectos antioxidantes está aún en estudio, pues se necesita ampliar la información sobre sus efectos en diferentes especies de carne y productos cárnicos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Evaluar el extracto del fruto de mullak'a (*Muehlenbeckia volcanica* (Benth) Endl) sobre las características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de la carne molida de alpaca en refrigeración.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Realizar un análisis fitoquímico preliminar al extracto hidroalcohólico del fruto de mullak'a.
2. Evaluar *in vitro* la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS, del extracto del fruto de mullak'a.
3. Evaluar la estabilidad de la carne en refrigeración al aplicar el extracto, respecto al pH, color, recuento microbiológico y parámetros sensoriales.
4. Comparar el efecto de la aplicación de un antioxidante sintético y el extracto del fruto de mullak'a en la carne molida de alpaca en refrigeración.

1.2 Hipótesis

El extracto del fruto de *Muehlenbeckia volcanica* (Benth) Endl. (mullak'a), presenta actividad antioxidante *in vitro*, y tiene efecto protector sobre parámetros de pH, color, microbiológico y sensorial; de manera similar al de un antioxidante sintético (BHT).

II. GENERALIDADES

2.1 Antecedentes generales de la especie mullak'a

2.1.1 Origen e historia

La mullak'a es una planta, cuyo nombre es de origen aymara, ya que se desarrolló en zonas donde se asentaron grandes culturas como Wari, Tiahuanaco. La flor de ésta especie posee un tinte de color azul oscuro que se utilizó desde épocas milenarias para teñir las fibras que se emplearon en la confección de textiles, también fue utilizada con fines medicinales para curar el afta, combatir el asma y controlar la fiebre.¹⁴

2.1.2 Características botánicas

Muehlenbeckia volcanica (Bentham.) Endlicher (*mullak'a*), es un pequeño arbusto que crece preferentemente en las alturas andinas, es lampiño, muy ramoso y semitrepador. Alcanza a medir 20 cm de altura; esta especie posee las hojas orbiculares pequeñas de color verde intenso, uniformemente alternas enteras simples como se observa en la figura N°1. Las flores son pequeñas dispuestas en racimo con pétalos polimórficos pentaméricos como se muestra en la figura N°2. Los frutos en aquenio aplanado de color negruzco azulado como se muestra en la figura N°3. Su denominación "volcánica", obedece al hecho de crecer entre rocas eruptivas. Florece en el mes de noviembre.¹⁵



FIGURA N°1: Planta de mullak'a

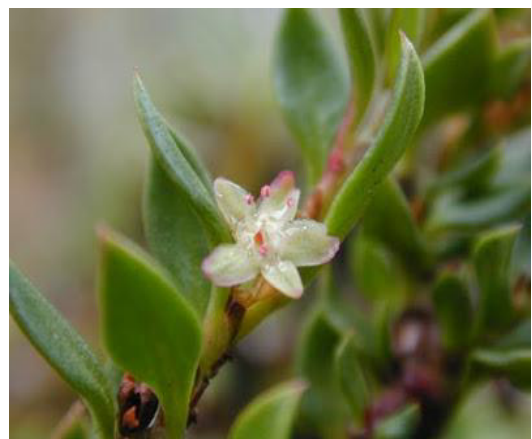


FIGURA N°2: Flor de mullak'a



FIGURA N°3: Fruto mullak'a

2.1.3 Ubicación taxonómica

Es un arbusto silvestre que crece en áreas distribuidas en terrenos secos, rocosos, arcillosos, laderas abiertas, pajonales abiertos.¹⁵ Crece en la Sierra entre 2400 - 4200 m.s.n.m.¹

La clasificación taxonómica se hizo en el Museo de Historia Natural del Perú, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988). (Anexo N°3)

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB-CLASE: CARYOPHYLLIDAE

ORDEN: POLYGONALES

FAMILIA: POLYGONACEAE

GÉNERO: *Muehlenbeckia*

ESPECIE: *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl.

Nombre vulgar: “mullak'a”

2.1.4 Distribución geográfica de la mullak'a por el Perú

Se tiene como 9 especies del género *Muehlenbeckia* en el Perú, la variedad *Muehlenbeckia volcánica* (Bentham.) Endlicher (Mullak'a) está presente en los departamentos de Ancash, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Junín, Lima, La Libertad y Puno.¹⁵ Además esta especie vegetal está diseminada en países como Colombia, Costa Rica, Guatemala, México, Bolivia y Ecuador.¹⁶



FIGURA N°4: Distribución geográfica de *Muehlenbeckia volcánica*.

2.1.5 Caracterización fisicoquímica del fruto de *Muehlenbeckia volcanica*

Los valores nutricionales y fisicoquímicos para los frutos de *Muehlenbeckia volcanica* según Teves y Torres² fueron los siguientes:

TABLA N°1: Caracterización fisicoquímica del fruto de *Muehlenbeckia volcanica*

Estudios preliminares	<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)
Humedad %	24.80
Proteínas %	38.50
Grasa %	0.015
Ceniza %	1.00
Fibra %	2.30
Carbohidratos %	33.00
Acidez %(ácido cítrico)	0.49
pH	4.99

2.1.6 Propiedades medicinales

La *Muehlenbeckia volcanica* (mullak'a) es usado para curar las aftas bucales donde las raíces son hervidas y se toma el mate cada cuatro horas, la fiebre para lo cual las raíces se hacen hervir para bañarse, el dolor de dientes para lo cual se mastican las hojas, diarrea donde se toma el jugo obtenido a partir de las hojas, inflamaciones internas para lo cual las ramas son reposadas y se toman en mate tres veces al día, enfermedades de los riñones para lo cual se hace hervir la raíz y se toma como refresco, enfermedades del hígado se hace hervir la raíz y se reposan las hojas, tomar el mate como refresco, tos de calor, las rafees son hervidas y se toma el mate como refresco.¹⁷ Mascando las hojas de *Muehlenbeckia volcanica* (mullak'a) se afirma la dentadura, la infusión de sus ramas u hojitas cura las siguientes enfermedades: la retención de orina, las disenterías, diarreas y toda inflamación intestinal. El cocimiento de la planta cura la diabetes.¹⁸

2.2 Antecedentes generales de la especie alpaca

2.2.1 Origen e historia

La familia Camelidae, engloba a los camélidos del viejo y el nuevo mundo (tribus Camelini y Lamini), quienes se originaron en América del Norte, aproximadamente 40 a 50 millones de años atrás. Posteriormente la tribu Lamini migra hacia América del Sur, los cuales dieron origen a los géneros Lama y Vicugna, resultando ser los únicos sobrevivientes de la tribu Lamini.¹⁹ Análisis de ADN a estos Camélidos Sud Americanos (CSA) han permitido determinar que la alpaca procede de la vicuña.²⁰ Por lo tanto, se ha reclasificado la alpaca, antes llamada *Lama pacos*, denominada ahora como *Vicugna pacos*.²¹

Clasificación taxonómica de la especie *Vicugna pacos*²⁰

CLASE: Mamífero

ORDEN: Artiodactyla

SUB-ORDEN: Tylopoda

FAMILIA: Camelidae

TRIBU: Lamini

GENERO: Vicugna

ESPECIE: *Vicugna pacos*

Nombre Común: Alpaca

2.2.2 Distribución geográfica de la alpaca por el Perú

El Perú es el principal productor de camélidos sudamericanos del mundo con poco más de 5 000 000 cabezas entre las cuatro especies, de las cuales 3 685,5 son alpacas y representan más del 85% de las existentes en el mundo. Las alpacas huacayas representa el 80,4% del total, seguida de la raza suri con 12,2% y Cruzados con 7,3%. Las alpacas se encuentran distribuidas en mayor proporción en la zona sur del Perú, a una altitud entre 3800 y 5000 msnm, con una temperatura promedio de 6°C, siendo el departamento de Puno el que posee la mayor población (147 821 cabezas), seguida por Cuzco (517 965 cabezas), Arequipa (477 851 cabezas) Apurímac (224 855 cabezas), Huancavelica (302 609 cabezas), Moquegua (1126 134 cabezas), Pasco (147 821 cabezas).²²

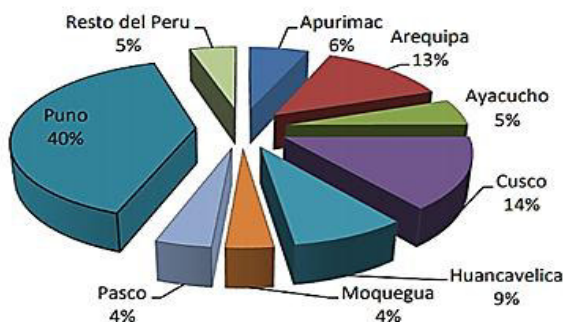


FIGURA Nº5: Distribución geográfica poblacional de alpacas en los departamentos del Perú.²²

2.2.3 Producción de carne de alpaca

La carne en general comprende, la parte muscular del animal beneficiado formado por el tejido blando, incluyendo su grasa, tendones, vasos y nervios.²³

La producción de carne de alpaca depende naturalmente de la saca anual, es decir, del número de animales que cada año se descartan del rebaño para ser destinados al sacrificio. Aunque no hay datos concretos. Estima que el porcentaje de saca anual, tanto en alpacas como en llamas, es del orden del 10 al 12 por ciento.²⁴

En la tabla Nº 2 se observa la producción de carne de alpaca y llama en Perú, destacando una tendencia creciente en la producción de carne de alpaca, que supera las 12 mil toneladas métricas en el año 2014.²⁵

TABLA N°2: Producción de carne de alpacas y llamas en Perú (expresado en toneladas métricas).²⁵

Año	Producción (Toneladas)	
	Alpacas	Llamas
2000	7797	3186
2001	7713	3200
2002	8277	3446
2002	8204	4352
2003	9358	3842
2004	8867	3773
2005	8916	3883
2006	9366	4053
2007	9517	3952
2008	10189	4146
2010	10761	4075
2011	11318	4235
2012	11999	4350
2013	12169	4179
2014	12594	4170

Adicionalmente, existen múltiples estudios que buscan ampliar las posibilidades de consumo de carne de alpaca, mediante su utilización en la preparación de: chorizo ahumado²⁶, hot dog y mortadela²⁷, salchicha frankfurt y jamón ahumado²⁸, y otras opciones propuestas²⁹. Sin embargo, la elaboración de embutidos y otros productos cárnicos a base de carne de alpaca aún no ha alcanzado gran magnitud pese al gran potencial que se le puede atribuir y solamente se ha efectuado a nivel de pruebas pilotos o para autoconsumo en las comunidades.³⁰

Últimamente, debido a la mayor cantidad de dinero que se obtiene por la venta de carne de alpacas de entre 1.5 y 2 años de edad, con respecto a los obtenidos por la venta de animales mayores (justificado por la mayor calidad de la carne de los animales jóvenes), por parte del sector productivo y de diversas organizaciones, se muestra un interés creciente en promover la venta de alpaca joven para carne y fomentar el consumo de su carne, fresca o transformada (en preparados o productos cárnicos).³¹

2.2.4 Composición Química de la carne de alpaca

Se estudió la composición química de la carne de alpaca evaluando el músculo de *Longissimus thoracis* y *lumborum* de llamas y alpacas machos de 25 meses de edad criados de forma tradicional en Perú, caracterizando los componentes principales para cada una de estas especies, los resultados se muestran en la tabla N°3. Dicho estudio manifiesta que la carne de alpaca es baja en grasa y presenta un contenido de proteínas elevado con respecto a carne de rumiantes más convencionales y de cerdo.³²

TABLA N°3: Composición química del musculo *Longissimus thoracis* y *lumborum* de alpacas y llamas.³²

	Alpaca (n=20) Promedio ± SD	Llama (n=20) Promedio ± SD
Humedad (%)	73.64 ± 1.66	73.94 ± 1.87
Grasa (%)	0.49 ± 0.01	0.51 ± 0.01
Proteína (%)	23.33 ± 0.69	23.12 ± 0.88
Cenizas (%)	2.54 ± 0.20	2.43 ± 0.25

Es importante mencionar que los valores de colesterol de la carne de alpaca del músculo *L. dorsi* son al menos 10-30 mg/100 g inferiores que los valores encontrados en el músculo *L. dorsi* de la carne de vacuno, ovino y porcino; los cuales presentan cantidades de 71 mg/100g .³³

2.2.5 Requisitos generales

Las carcasas y cortes deberán proceder de animales sanos, faenados bajo inspección veterinaria y de plantas faenadoras o camales autorizados por la autoridad competente.

Las carcasas y cortes deben cumplir con la NTP 201.018.

No deberán tener residuos de antibióticos, conservadores, ablandadores o sustancias que por su naturaleza atentan contra la salud del consumidor. El pH debe estar dentro de un rango comprendido entre 5.5 y 6.4.

Deberán cumplir los requisitos fijados por las normas del Codex alimentarius sobre residuos de plaguicidas y aditivos alimentarios.³⁴

2.2.6 Características organolépticas

Aspecto general: Deberán presentar una buena conformación y acabado

Color: Característico de acuerdo a la especie.

Olor: Sui generis y exento de cualquier olor a normal.

Consistencia: Firme al tacto, tanto el tejido muscular como la grasa.³⁴

2.2.7 Criterios microbiológicos

TABLA N° 4: Criterios microbiológicos para la carne molida según “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano”

Carnes crudas, picadas y molidas						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g.	
					m	M
Aerobios mesófilos (30°C)	2	3	5	2	10 ⁶	10 ⁷
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	50	5x10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	5	2	10 ²	10 ³
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25g	-----
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	10	2	5	0	Ausencia/25g	-----

Fuente: R.M. N° 591-2008/MINSA³⁵

2.2.8 Temperatura y procedimientos de conservación por frío

Las temperaturas y procedimientos para la conservación por frío: refrigeración y congelación deben satisfacer los parámetros tecnológicos de utilización que aseguren y preserven la calidad de la carcasa y de todas las porciones comestibles de la misma.

2.2.8.1 Refrigeración:

La temperatura en la zona de almacenamiento se deberá mantener entre -2°C y 4°C. Las carcasas y cortes se deberán almacenar de modo de evitar el deterioro y la multiplicación de microorganismos. Se deberá inspeccionar y despachar teniendo en cuenta una adecuada rotación y manteniendo las condiciones de limpieza e higiene que garanticen un buen estado sanitario de las cámaras.³⁴

2.3 Radicales libres

Los radicales libres (RL) son especies químicas (moléculas o átomos) que poseen al menos un electrón desapareado en su orbital externo, no compartido en capacidad de aparearse, lo cual les hace altamente inestables, es decir son de vida corta, y reactivas. Para estabilizarse reaccionaran rápidamente intentando captar un electrón de las moléculas adyacentes estables mediante reacciones de óxido-reducción, cuando la molécula que ha sido atacada ha perdido un electrón se convierte en un radical libre, generándose así una reacción en cadena en la cual se forman más radicales libres o se forman otras sustancias tóxicas con potenciales reacciones en cadena destructoras de nuestras células.³⁶ Aunque los radicales libres son de vida muy corta (del orden de una milésima de segundo), son tremendamente reactivos. Los radicales libres se pueden formar en el interior o exterior de las células, o incluso diseminadas por todo el organismo, como producto de sus actividades fisiológicas normales, a partir de procesos como la hipoxia, de fuentes exógenas como radiaciones, fármacos, contaminantes ambientales y de la dieta, entre otros.³⁷

Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP. Otras fuentes de RL son los peroxisomas, organelos del citosol muy ricos en oxidasas, generan H₂O₂ el cual es depurado por enzimas específicas como la catalasa, y es transformado en agua, tal como se muestra en la figura N°6.³⁷



FIGURA N°6: Formación de radicales libres.

2.4 Factores para la producción de radicales libres

2.4.1 Oxidación de Lípidos

Los sustratos necesarios para que se produzca la oxidación de lípidos incluyen ácidos grasos insaturados, el oxígeno y las especies químicas que aceleran la oxidación, los cuales son abundantes en las carnes expuestas aeróbicamente, así como también, Propiedades intrínsecas y pasos del procesamiento pueden predisponer a la carne a la oxidación de lípidos.³⁸

A pesar que en la carne la mayoría de la grasa es saturada, las membranas celulares contienen fosfolípidos, y los ácidos grasos poliinsaturados que los constituyen son los que reaccionan con el oxígeno.³⁹ Los principales ácidos grasos insaturados que constituyen los lípidos de los tejidos animales son el oleico, linoleico, linolénico y araquidónico. Su auto-oxidación da lugar a una cantidad diferente de hidroperóxidos que, en conjunto con las distintas vías de descomposición involucradas, conducen a un gran número de compuestos volátiles.⁴⁰

La oxidación de lípidos incluye especies químicas que se forman durante el inicio y la propagación de los primeros pasos. Alquilo, alcoxi y radicales peroxi, todo puede ser producido a partir de los protones fácilmente abstraídos de moléculas vecinas. Los peróxidos se forman comúnmente como productos primarios, proceso bastante complejo, mediante el cual, los ácidos grasos insaturados reaccionan con el oxígeno molecular a través de un mecanismo en cadena con radicales libres y puede someterse posteriormente la escisión de menor peso molecular para formar productos de oxidación secundarios, incluyendo aldehídos, cetonas y epóxidos. Ejemplos específicos y bien conocidos de estos incluyen hexanal, propanal, malondialdehído.³⁸

Una oxidación de lípidos excesiva repercute negativamente en las características de calidad de la carne fresca, fundamentalmente por la presencia de olores y sabores desagradables (olor a rancio, sabores anómalos, etc.), decoloración y pérdida de uniformidad en el color (por oxidación de los pigmentos de la carne), exudado (probablemente por ruptura de las membranas celulares).⁴¹

Finalmente, la ingestión de radicales libres y de alguno de los productos finales de la oxidación se asocia con el desarrollo de enfermedades degenerativas en el consumidor (tumores, enfermedad cardiovascular, etc.), lo que provoca una creciente preocupación social.⁴¹

Existen algunas formas de prevenir la rancidez oxidativa, las cuales son⁴²:

- Una disminución de la temperatura de almacenamiento
- Usar envases impermeables a la luz, preferentemente de color ámbar
- Regular el contenido de humedad
- Evitar la contaminación con pro-oxidantes
- Conservar los productos haciendo uso de antioxidantes naturales
- Disminuir el nivel de oxígeno

2.4.2 Mecanismo de oxidación de lípidos

Una de las principales dianas de los procesos de oxidación inducidos por los radicales libres son los ácidos grasos poliinsaturados presentes, mayoritariamente, en las membranas celulares. El daño a los lípidos consta de tres etapas, iniciación, propagación y terminación.⁴³ las cuales se ilustran en la Figura N°7 y se explican a continuación:

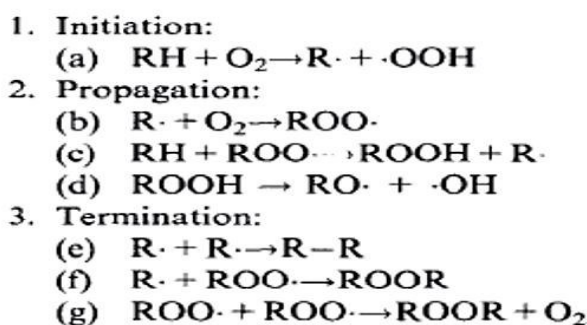


FIGURA N°7: Reacciones involucradas en la auto-oxidación de lípidos.⁴⁴

2.4.2.1 Iniciación

La etapa de iniciación se lleva a cabo mediante la eliminación de hidrógeno de un carbono de metileno de un ácido graso (RH) para formar una radical alquilo (R°). Este proceso afecta a los ácidos grasos poliinsaturados preferentemente porque es más fácil para eliminar el hidrógeno a partir de un de carbono de metileno, así como el número de dobles enlaces en el ácido graso aumenten. La oxidación de lípidos se inicia por un gran número de moléculas en los músculos, incluyendo productos químicos tales como especies reactivas de oxígeno (OH°) y el complejo de oxígeno hierro.⁴⁵

2.4.2.2 Propagación

En esta segunda etapa, el radical libre formado puede reaccionar con el oxígeno molecular y formar un radical peróxilo ($\text{ROO}\cdot$). Este radical puede sustraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso insaturado para formar un hidroperóxido (ROOH) y un radical lipídico.⁴⁶ La formación de este radical libre hace que el proceso sea autopropagable.⁴⁷ Esta etapa también puede iniciarse en el radical peróxilo formado por foto-oxidación o iniciación enzimática. Los radicales alcoxilo procedentes de la descomposición de hidroperóxidos también pueden iniciar la oxidación lipídica.⁴⁸

2.4.2.3 Terminación

La etapa de terminación comienza por la descomposición de radicales e hidroperóxidos lleva a la formación de numerosos compuestos volátiles y no volátiles a través de un conjunto muy complejo reacciones.⁴⁵ Se generan compuestos para generar moléculas estables de bajo peso molecular (productos de la oxidación lipídica secundaria) tal como hidrocarburos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, ésteres, lactonas y una extensa variedad de compuestos que contienen nitrógeno y azufre.⁴⁹

La paralización de la reacción en cadena se da normalmente por la reacción entre sí de los radicales (libres y peróxilos) o cuando el sustrato oxidable se agota.⁵⁰ La reacción también puede detenerse mediante la incorporación de un antioxidante, el cual actúa como un atrapante de radicales libres, finalizando la fase de propagación. El electrón no pareado del antioxidante se deslocaliza dentro de la estructura del anillo aromático lo que estabiliza al compuesto formado.⁵¹

2.5 Antioxidantes

Los Antioxidantes son compuestos los cuales pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Los antioxidantes se dividen en dos categorías principalmente que son: sintéticos y naturales. En general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminos) o carotenoides así como el ácido ascórbico.⁵² Los antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (Butil-hidroxianisol y Butil-hidroxitolueno) han sido utilizados como antioxidantes desde principios del siglo pasado.⁵³

Sin embargo, se han impuesto medidas de precaución y se ha restringido su uso debido a su carcinogenicidad. Debido a esto, el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado considerablemente ya que la capacidad de actuar como antioxidante se ha demostrado en el laboratorio y mencionado en la literatura.⁵⁴

Muchos antioxidantes naturales, en especial los flavonoides, muestran un amplio rango de efectos biológicos incluyendo funciones antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas y vasodilatadores. Una terapia antioxidante provee una alternativa barata para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo ya que se ha demostrado el efecto antioxidante de productos naturales provenientes de las plantas. La actividad antioxidante y su relación con la propiedad curativa de una gran cantidad de plantas medicinales han sido reportadas en diversas investigaciones.⁵⁴

2.5.1 Clasificación de los antioxidantes según su mecanismo de acción

Con respecto al mecanismo de acción, los antioxidantes se pueden dividir en los siguientes siete grupos.

TABLA Nº5: Mecanismos de acción de algunos antioxidantes.⁵⁵

Tipo de antioxidante	Mecanismo de acción	Ejemplo de antioxidante
Los antioxidantes que rompen las cadenas por reacción con radicales peroxilo	Estos son compuestos reductores con relativamente enlaces O-H y enlaces N-H débiles, que reaccionan fácilmente con los radicales peroxilo para la formación de radicales intermedios de baja actividad.	Fenoles Naftoles Hidroquinonas Aminofenoles Diaminas Quinonas
Los antioxidantes que rompen las cadenas por reacción con radicales alquilo.	Estos son compuestos, que aceptan fácilmente los radicales alquilo. Estos antioxidantes son eficaces en concentraciones muy bajas de di-oxígeno y en polímeros sólidos.	Nitronas Radicales estables nitroxilo y nitrocompuestos carotenoides Sulfuros Fosfitos
Antioxidantes que descomponen hidroperóxido.	Estos son compuestos que reaccionan con hidroperóxidos sin la formación de radicales libres.	Carbamatos Algunos complejos de metales Proteínas Aminoácidos
Antioxidantes que desactivan metales.	Ligandos compuestos metálicos a compuestos inactivos	Óxidos de hidroperóxidos Diaminas Hidroxiácidos Aminas
Cadena cíclica, terminación por los antioxidantes.	En otras palabras, la terminación de la cadena se produce como un proceso cíclico catalítico (los antioxidantes se regeneran en las reacciones de terminación de la cadena). La terminación de la cadena múltiple puede tener lugar, por ejemplo, en los polímeros.	aromáticas, los radicales nitroxilo, y compuestos que poseen metales de valencia variable
Los inhibidores de la acción combinada.	Algunos antioxidantes pueden interactuar con los radicales R^* y RO_2^* . Sin embargo, una molécula de inhibidor puede tener dos o más grupos funcionales, cada uno de los que puede someterse a su propia reacción.	Antraceno Metilenequinona Carbonatos Tiofosfatos
Sinergismo de varios antioxidantes.	Cuando dos inhibidores mutuamente mejoran sus efectos inhibitorios, es una acción sinérgica.	Ácido cítrico Ácido ascórbico

2.6 Polifenoles

2.6.1 Actividad biológica de los compuestos fenólicos

Los polifenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, han sido ampliamente investigados por exhibir actividad biológica antitumoral y antioxidativa y se pueden encontrar en distintas clases de té, como el té verde y el té negro (*Camellia sinensis*), frutas como la uva, legumbres como la soya y vegetales como el brócoli, cebolla, pimientos, entre otros.⁵⁶

Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres.⁵⁷

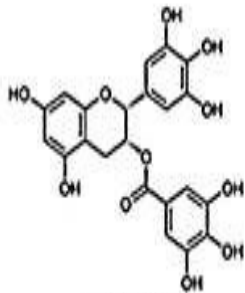
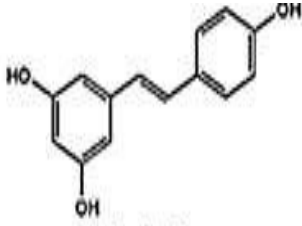
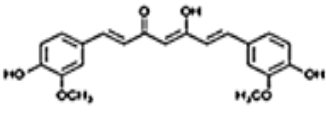
En los últimos años ha cobrado especial interés, el estudio de la actividad biológica de los polifenoles y en especial la evaluación de la capacidad antioxidante asociada a ellos. Los polifenoles en vegetales, frutas y té pueden prevenir enfermedades degenerativas, incluyendo cánceres, con la acción antioxidante. Estos efectos son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes que pueden usualmente justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como sus acciones antitrombóticas, antilipémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas.⁵⁸

Los polifenoles poseen acciones antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlceras, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha verificado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV) y del virus simplex humano (HSV), inhiben las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* (caries dental), inhiben la autoxidación del ascorbato, también inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantinamonoamina oxidasa. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento.⁵⁹

Se determinó que la ingesta de flavonoides en la dieta, la mayoría a partir de té, se asoció con una reducción de las muertes por enfermedades coronarias. Los flavonoides de las plantas, específicamente los del té, son poderosos antioxidantes, comprobados in vitro en un sistema de oxidación de lipoproteínas (LDL) simulando lo que ocurre en el cuerpo humano.⁶⁰

Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen actividad anticancerígena, antiviral, antiinflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar; y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la aterogénesis, trombosis y carcinogénesis. Sus propiedades conocidas incluyen la captura de radicales libres, fuerte actividad antioxidante, inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, ciclooxigenasa, lipoxigenasa) y acción antiinflamatoria.⁶⁰

TABLA N°6: Ejemplo de polifenoles y su actividad biológica frente a diferentes líneas tumorales y en modelos animales. Se observa la estructura y fuentes principales de obtención natural.⁶¹

Compuesto	Estructura/Fuente	Actividad Biológica
EGCG	 $C_{22}H_{18}O_{11}$ Te verde	<p>Inhibe el crecimiento de las células de cáncer de cuello uterino</p> <p>Inhibición de la metilación del DNA y efectos anti oxidativos</p> <p>Disminuye el tamaño y el número de tumores de piel y duodenales en ratones</p>
Resveratrol	 $C_{14}H_{12}O_3$ Uvas	<p>Inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno e induce la apoptosis</p> <p>Suprime el crecimiento de células tumorales de piel.</p>
Curcumina	 Curcuma	<p>Inhibe la proliferación y favorece la apoptosis en líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello</p>

Genisteína	<p>Soya</p>	Exhibe actividad antitumoral y antiproliferativa en modelos de ratón con cáncer de próstata
Quercetina	<p>Cebolla</p>	Inhibe la actividad del proteasoma e induce apoptosis en células jurkat.

2.6.2 Los polifenoles como antioxidantes naturales

La principal propiedad de los polifenoles es su actividad antioxidante, con numerosos trabajos que inciden sobre ello, no en vano son los antioxidantes más abundantes en la dieta. Esta propiedad depende del estado de hidroxilación de sus anillos aromáticos.⁶²

Entre los efectos antioxidantes de los polifenoles se incluyen los siguientes: (a) eliminación de radicales libres (b) quelación y estabilización de cationes divalentes, y (c) modulación de enzimas antioxidantes endógenas.⁶³ Debido a que los polifenoles son compuestos sensibles a la óxido-reducción dependiendo del tipo de célula, dosis, y/o el tiempo de tratamiento, también pueden actuar como agentes pro-oxidantes, incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno y, por lo tanto, reducir el crecimiento celular.⁶⁴

Hay experimentos clínicos que han demostrado que los polifenoles disminuyen los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, por Reactive Oxygen Species) concretamente flavonoides tales como quercetina o catequina pueden capturar directamente ROS, tales como O_2 , H_2O_2 o $HClO$.⁶⁵ Como se ha mencionado, los polifenoles también pueden potenciar los sistemas de desintoxicación celular, tales como la superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa e inhibir las enzimas generadoras de ROS, tales como la xantina oxidasa o la lipoxigenasa.⁶⁶

La acción antioxidante de los polifenoles se traduce en otras actividades potenciales, como antiinflamatoria, vasodilatadora, antitrombótica, antiapoptótica, o efectos antiaterogénicos.⁶⁷ Todas estas actividades se pueden ver traducidas en la reducción del crecimiento de ciertas líneas celulares cancerosas, y son cada vez más las investigaciones que atribuyen actividades antitumorales a los polifenoles.⁶⁸

Existen antioxidantes de fuentes sintéticas o naturales. Ciertos antioxidantes sintéticos pueden tener efectos carcinogénicos o tóxicos al estar en exceso en el cuerpo humano, por eso la industria ha puesto atención al uso de antioxidantes naturales considerando que reemplacen a los sintéticos en algunas aplicaciones.⁶⁹ Productos con alto contenido de flavonoides, fenoles y tocoferoles suelen ser catalogados como fuentes naturales de antioxidantes, así como el extracto de menta, de romero y de aceite de oliva.⁷⁰

2.6.3 Biosíntesis de los polifenoles

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido siquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas.⁵⁸

La ruta del ácido siquímico es dependiente de la luz. Se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa-4-fostato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis. Tras diversas modificaciones, se obtiene el ácido siquímico, del que derivan directamente algunos fenoles.

La vía del ácido siquímico puede continuar con la adhesión de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, dando lugar a la fenilalanina, un aminoácido esencial propio del metabolismo primario de las plantas. La fenilalanina entra a formar parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando.⁵⁸

La fenilalanina en el ácido trans-cinámico. Posteriormente, el ácido trans-cinámico se transforma en ácido p-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático. La acción de una Coenzima A (CoA), la CoA-ligasa, transforma el ácido p-cumárico en p-cumaroilCoA, que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles de origen vegetal.

La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas.⁶⁹ Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido siquímico como de la ruta de los poliacetatos. Este es el caso de un importante grupo de moléculas biológicamente activas, denominadas genéricamente flavonoides, tal como se muestra en la figura N°8.

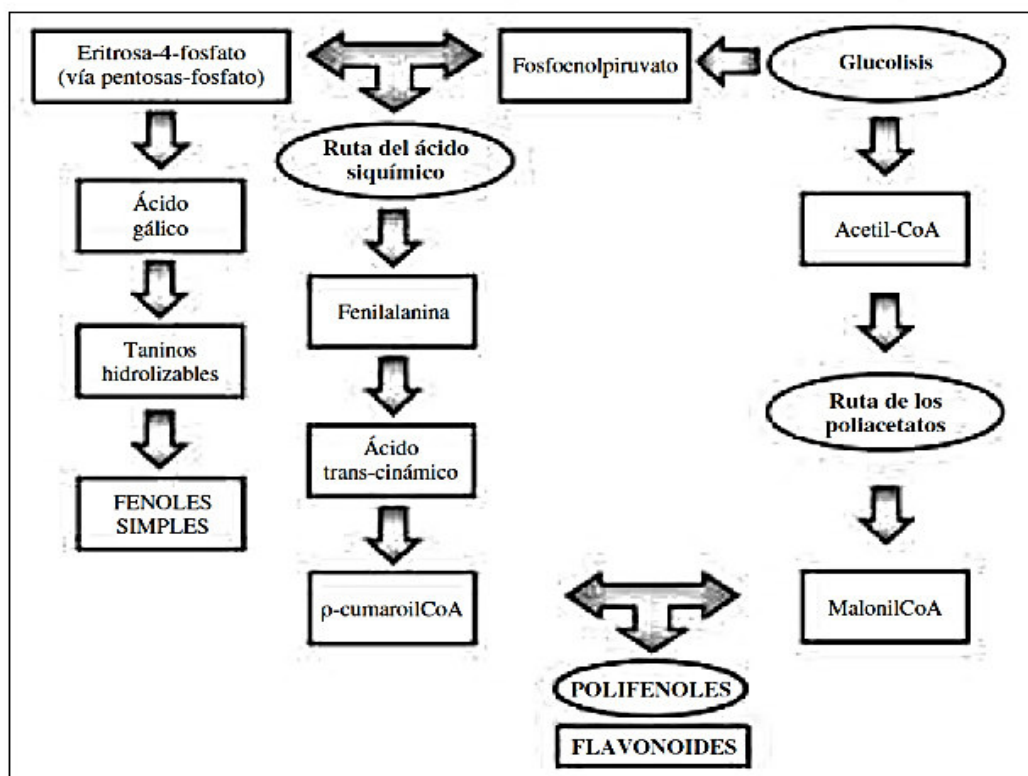


FIGURA N°8: Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles en las plantas CoA=Coenzima A. ⁶⁹

2.6.4 Clasificación y estructura química de los polifenoles

Los polifenoles comprenden una amplia variedad de moléculas que incluyen desde Compuestos altamente polimerizados hasta moléculas simples con un solo anillo fenólico en su estructura, como los alcoholes y ácidos fenólicos.⁶³

Se han descrito más de 8000 polifenoles distintos que pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y el tipo de sustituyente unido a estos anillos. Las principales clases de polifenoles por ser los más ampliamente distribuidos en los alimentos son: flavonoides (Figura N°9), ácidos y alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos.⁶³ (Figura N°10).

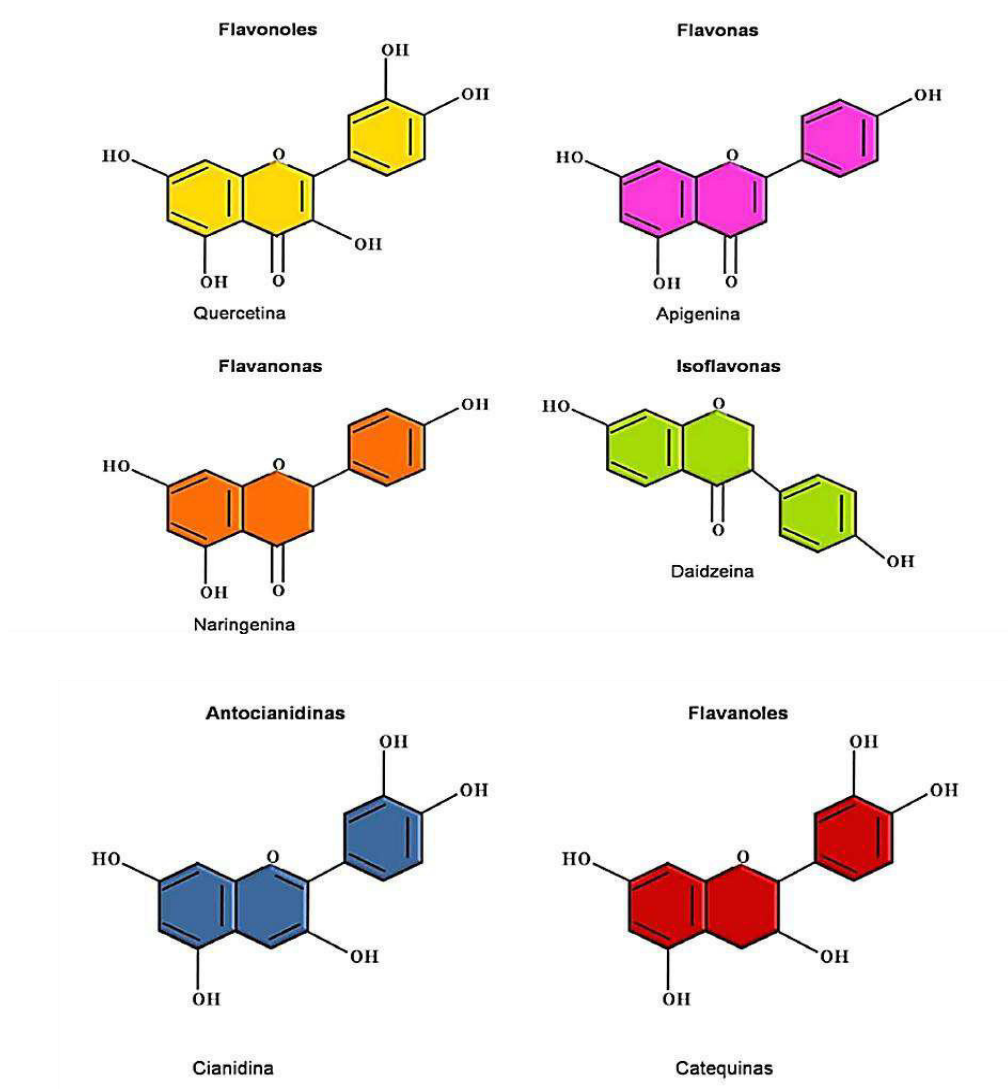
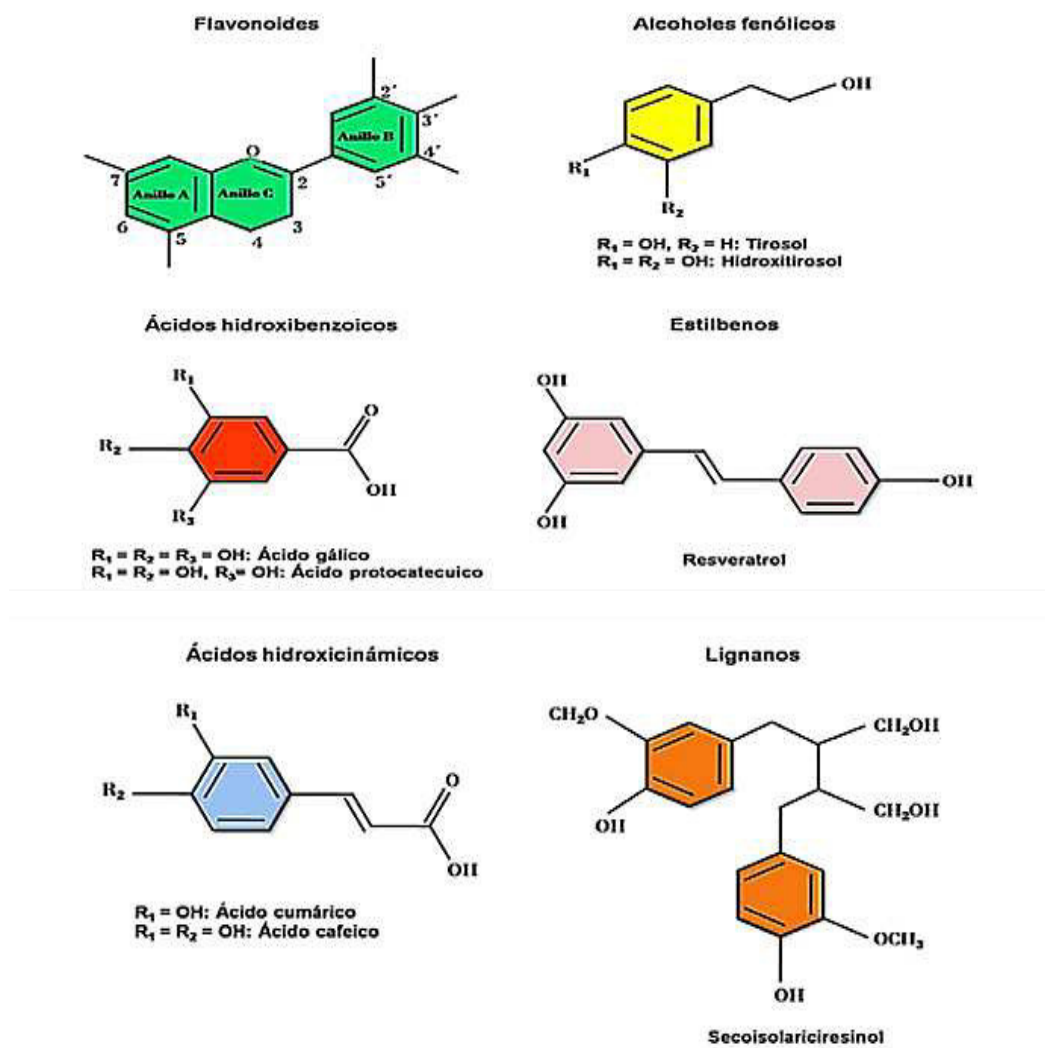


FIGURA N°9: Principales clases de flavonoides.⁶⁴



FIGURANº10: Principales clases de polifenoles.⁶⁴

2.6.5 Actividad antioxidante de los polifenoles: mecanismo

Aunque, como se ha explicado, existen una gran cantidad de mecanismos por los que los antioxidantes reaccionan con los radicales libres, como en el caso de los polifenoles, que detienen el proceso en cadena de oxidación lipídica (chain- breaking), esta reacción se puede llevar a cabo por dos posibles vías: reacciones de transferencia de un átomo de H (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET), aspectos que se deben tener en cuenta al seleccionar un método de medida de actividad antioxidante, por lo que, a continuación, se explicará brevemente en qué consiste cada uno de estos dos mecanismos.

En las reacciones HAT (figura N°11), la reacción sería de este tipo, siendo X• el radical libre y AH el antioxidante:



FIGURA N°11: Reacciones HAT

El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial.

Por el contrario, en las reacciones SET (figura N°12) el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales, y serían reacciones de este tipo, siendo de nuevo X• el radical libre y AH el antioxidante:

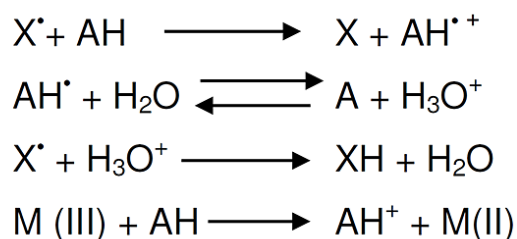


FIGURA N°12: Reacciones SET

Las reacciones HAT vienen determinadas por la entalpía de disociación, de manera que un compuesto que la tuviera baja facilitaría la abstracción del átomo de H. Así mismo, se ha observado que ciertos aspectos estructurales, como la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes, pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación, facilitando la formación de un radical estable. Por el contrario, las reacciones SET dependen del potencial de ionización.⁷¹

2.7 Butilhidroxitolueno (BHT)

2.7.1 Descripción y regulación según CODEX ALIMENTARIUS⁷²

Descripción: El BHT es una sustancia blanca, sólida cristalina o en copos, inodoro o con un tenue olor característico.

Número INS: 321

Nombre Químico: 2,6-di-terc-butil-p-cresol o 4-metil-2,6-di-terc-butil-fenol

Número C.A.S.: 128-37-0

Fórmula Química: $C_{15}H_{24}O$

Peso Molecular: 220.36

Solubilidad: Insoluble en agua y propano-1,2-diol; soluble en etanol.

I.D.A: El Comité Mixto de Expertos en aditivos alimentarios de la FAO / OMS aprobaron una ingesta diaria aceptable para el hombre de 0,3 mg BHT / kg.

2.7.2 Propiedades químicas del BHT

El BHT es un compuesto químico que agregado a las grasas, aceites vegetales y animales o a los alimentos que los contienen, les proporcionan estabilidad y duración contra el proceso de la oxidación, el cual conduce a la rancidez, la que se manifiesta en los alimentos por alteraciones en el aroma y sabor o bien por la pérdida de potencia. El BHT tiene aspecto de cristales granulares blancos de olor muy ligero. Guardado en lugar fresco y a la sombra, su estabilidad puede considerarse indefinida, sin embargo, la luz y el largo almacenamiento en presencia de oxígeno le dan un color amarillo, lo cual no afecta sus propiedades antioxidantes. No es tóxico, no confiere sabor u olor a los productos a los que se agrega si se usa en las concentraciones recomendadas, resiste a las altas temperaturas.⁷³

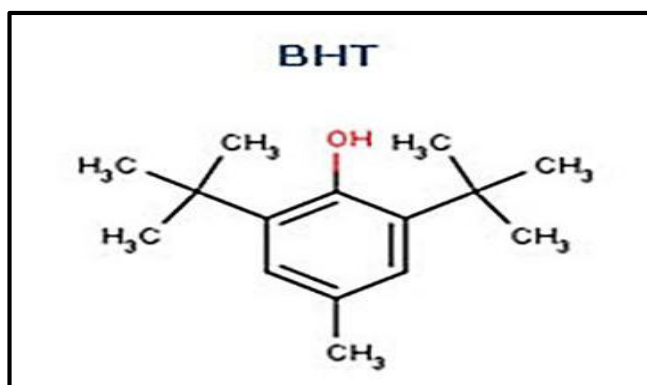


FIGURA N° 13: Estructura química del BHT. Fuente: Ferretti G, 2010.⁷⁴

2.7.3 Metabolismo del BHT

El BHT no se produce en la naturaleza por lo que es elaborado sintéticamente a partir de p-cresol e isobutileno. Es uno de los antioxidantes fenólicos sintéticos más ampliamente utilizados en alimentos, principalmente en alimentos que contienen grasas y aceites, envases de alimentos, materiales de envasado y en cosmética. Grasas, aceites y grasa que contienen los alimentos son naturalmente susceptibles a la rancidez y a las reacciones de oxidación.

El BHT actúa como un eliminador de radicales libres, previniendo la rancidificación al terminar con la reacción en cadena. Se metaboliza principalmente en el microsoma hepático y también en el pulmón; sus productos finales del metabolismo son una variedad de conjugados de sulfato y ácido glucurónico que finalmente se excreta en la orina y las heces y, en cierta medida, a través de la bilis.

El metabolismo mediado por el citocromo P450 en el hígado causa la formación de un metabolito electrofílico BHT quinona metida (BHT-QM) 2,6-di-terc-butil-4metilenciclohexano-2,5-dienona) un metabolito intermedio del BHT que puede unirse covalentemente a varios nucleófilos celulares, especialmente aquellos que contienen grupos sulfhidrilo como la cisteína y glutatión que, en consecuencia, conduce a hepatotoxicidad aguda y neumotoxicidad. El BHT se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y se distribuye al hígado y la grasa corporal.⁷⁵

Los compuestos BHT han sido sometidos a extensos estudios toxicológicos en varios animales. El valor LD50 de BHT en ratas cuando se administra por vía oral es > 2930 mg / kg de peso corporal. En dosis altas se sabe que causa muerte hemorrágica debido a la inhibición de la síntesis de protrombina hepática. BHT puede actuar como promotor y antipromotor de la carcinogénesis. A pesar de los efectos antioxidantes y antivirales, muchas preguntas sobre el uso de BHT en la medicina humana siguen sin respuesta.⁷⁵

2.7.4 El BHT como antioxidante

Es un antioxidante sintético utilizado ampliamente en la industria de alimentos. Está disponible comercialmente como un compuesto cristalino blanco. Como monofenol, el BHT puede donar un hidrógeno y así unirse a radicales peróxido de los lípidos. Es más efectivo para evitar la oxidación de grasas animales que de aceites vegetales. Debido a su naturaleza volátil, el BHT es un importante aditivo utilizado en el empaque de alimentos, por lo que se aplica como una emulsión.⁷⁶

El Comité Mixto de Expertos en aditivos alimentarios de la FAO / OMS ha determinado las cantidades máximas permitidas de BHT para la categoría de alimentos que incluyen a productos de carnes, el cual indica 100 mg/Kg como nivel máximo.

2.7.5 Actividad antioxidante del BHT: mecanismo

Entre los compuestos antioxidantes sintéticos de uso común se encuentran el butilhidroxitolueno (BHT). Su mecanismo de acción es similar a los antioxidantes primarios al reaccionar con el radical peroxi producido por la oxidación de las grasas.⁷⁷

El principal mecanismo que exhiben los antioxidantes primarios es la donación de un átomo de hidrógeno al radical peroxi formando un radical peróxido, el radical nuevo exhibe menor energía lo que asegura su menor reactividad para catalizar la oxidación de otras moléculas, este nuevo radical es estabilizado mediante la deslocalización del electrón impar próximo al anillo fenólico para formar un híbrido de resonancia estable⁷⁸, que se ilustra en la figura N°14.

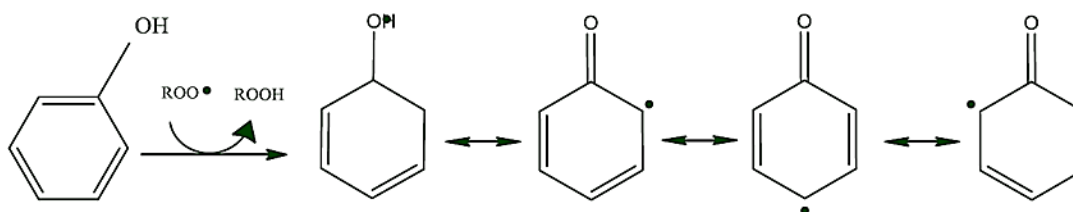


FIGURA N°14: Híbridos con resonancia estable de derivados de antioxidante fenólicos⁷⁸

Como se muestra en la Figura N°15, la efectividad de los antioxidantes primarios (AH) es influenciada por las propiedades químicas del compuesto, como los anillos fenólicos, enlaces de hidrogeno y resonancia, mismas que pueden facilitar la captación de radicales peróxido ($\text{ROO}\bullet$) en moléculas más estables (Figura N°15, Ec. 1-2,). Este tipo de antioxidantes son capaces de donar un átomo de hidrogeno a los radicales lipídicos produciendo moléculas ($\text{A}\bullet$) que son estables y menos disponibles para participar en las reacciones de propagación (baja velocidad de reacción) (Figura 15, Ec. 2). Durante la propagación los radicales peróxido tienen una menor energía de reacción que los radicales alcoxi, los radicales peróxido pueden interactuar con más facilidad con los antioxidantes primarios que con los lípidos insaturados.⁷⁷ Como los captadores de radicales libres se encuentran en bajas concentraciones no compiten efectivamente con los radicales iniciadores como los radicales hidroxilo.

De esta manera los antioxidantes primarios interactúan con los radicales peróxido formados durante la propagación de la auto oxidación inhibiendo la generación de nuevos radicales peróxido (Figura N°15, Ec. 3) y la interacción de los radicales alcoxi ($\text{RO}\bullet$) que disminuye la descomposición de hidroperóxidos (Figura N°15, Ec. 4), finalmente la reacción termina con la inactivación de los radicales peróxido, alcoxi u otros radicales (Figura N°15, Ec. 4-5-6).⁷⁹

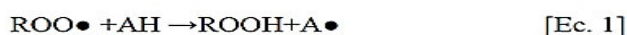


FIGURA N°15: Mecanismo de reacción de los antioxidantes primarios.⁷⁹

2.7.6 Efectos del uso del BHT

Desde hace bastantes años se ha trabajado mucho en comprobar la seguridad de los antioxidantes sintéticos para alimentos, cuyo uso ha sido regulado y restringido en muchos países, ya que se comprobó que niveles altos de BHT, BHA y TBHQ producen un aumento significativo del peso del hígado y una marcada proliferación del retículo endoplasmático.

Otras alteraciones señaladas han sido una disminución del crecimiento y caída del pelo en ratas, hiperplasia de las células epiteliales de los pliegues del estómago y un efecto tóxico en células de mono por parte del BHT.⁸⁰

Así mismo Otros estudios indican que el BHT puede ocasionar daños en otros órganos, como los pulmones y la mucosa gastro-intestinal.⁸¹ Por estas razones ha sido eliminado de la lista de aditivos para alimentos considerados como seguros (GRAS).⁸²

2.8 Uso de antioxidantes en carnes

Durante años se han desarrollado diversas estrategias para prevenir el deterioro oxidativo en productos de origen cárnico mediante el empleo de antioxidantes. La mayoría de estas estrategias se han centrado en limitar el acceso del oxígeno a los componentes de la carne susceptibles de sufrir fenómenos de oxidación como lípidos y proteínas. Al mismo tiempo se han desarrollado nuevos métodos de almacenamiento como el envasado al vacío o el envasado en atmósfera modificada con el fin de prevenir la aparición de fenómenos de oxidación en el producto final. Una forma de reducir la aparición de fenómenos de oxidación en la carne y/o los productos cárnicos es el uso de antioxidantes. Los antioxidantes tienen diferentes mecanismos de acción, unos impiden la formación de los radicales libres y/o especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los radicales libres y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación).⁸³

2.9 Efecto de la oxidación sobre la calidad de la carne

La exposición al oxígeno y la luz son uno de los principales factores que originan la aparición de fenómenos oxidativos en la carne y/o productos cárnicos. El oxígeno (O₂) constituye el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como “estrés oxidativo”, consecuencia de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los mecanismos de defensa antioxidantes.⁸⁴ Tanto lípidos como proteínas son susceptibles de sufrir dicho “estrés oxidativo”.

Los cambios asociados a la oxidación lipídica constituyen la principal causa de deterioro de la carne y/o productos cárnicos, ya que provocan la aparición de olores y sabores desagradables y la alteración del color, y en general una reducción de la calidad organoléptica del producto. Así mismo dan lugar a una disminución del valor nutritivo de la carne y la generación de compuestos potencialmente nocivos para la salud relacionados con el riesgo de padecer diversas patologías.⁸⁵

En este sentido, los radicales lipídicos, hidroperóxidos, malondialdehído (MDA) y productos específicos de la oxidación del colesterol juegan un papel importante en promover las reacciones oxidativas in vivo e iniciar reacciones perjudiciales con consecuencias nocivas para la salud. La ingesta de lípidos oxidados se cree que tienen un gran impacto sobre la salud del consumidor, así como también ciertos productos procedentes de la oxidación de lípidos están involucrados en el desarrollo de enfermedades como el cáncer y la cardiopatía coronaria.⁸⁶

2.10 Cuantificación de fenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C)

El reactivo de F-C utiliza un mecanismo de reacción de oxidación/reducción, que no es específico para fenoles. El ensayo de F-C mide la capacidad para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotungstico a un complejo azul que es monitoreado espectrofotométricamente, donde el molibdeno es reducido en el complejo y se da la reacción de transferencia de electrones entre el Mo(IV) y el reductor como se muestra en la figura N°16.⁸⁷ El método implica la oxidación de fenoles en solución alcalina por el heteropolianión molibdotungstosfosfórico amarillo y la medición colorimétrica del molibdotungstosfosfato azul resultante. Este complejo azul tiene su máxima absorción dependiendo de su composición fenólica, además del pH de las soluciones implicadas.⁸⁸



FIGURA N°16: Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de Folin-Ciocalteu.⁸⁷

2.11 Determinación de la actividad antioxidante

2.11.1 Ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Este método fue propuesto por Blois (1958)⁸⁹ en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH• para aceptar un átomo de hidrógeno (H•) proveniente de una molécula de cisteína.

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura N°17, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes.

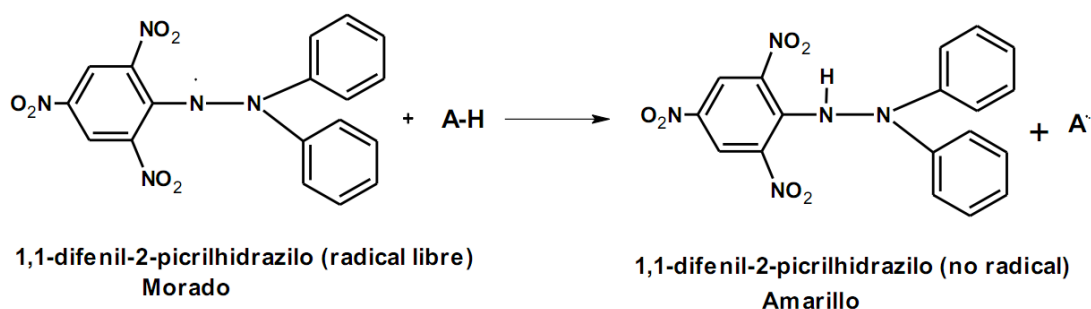


FIGURA N°17: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.⁹⁰

Los resultados del ensayo DPPH se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC₅₀), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC₅₀ cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH usado.⁹¹

2.11.2 Ensayo ABTS (Acido 2,2'- azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)

La generación del radical ABTS constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El ensayo original de ABTS estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Este fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes.⁹²

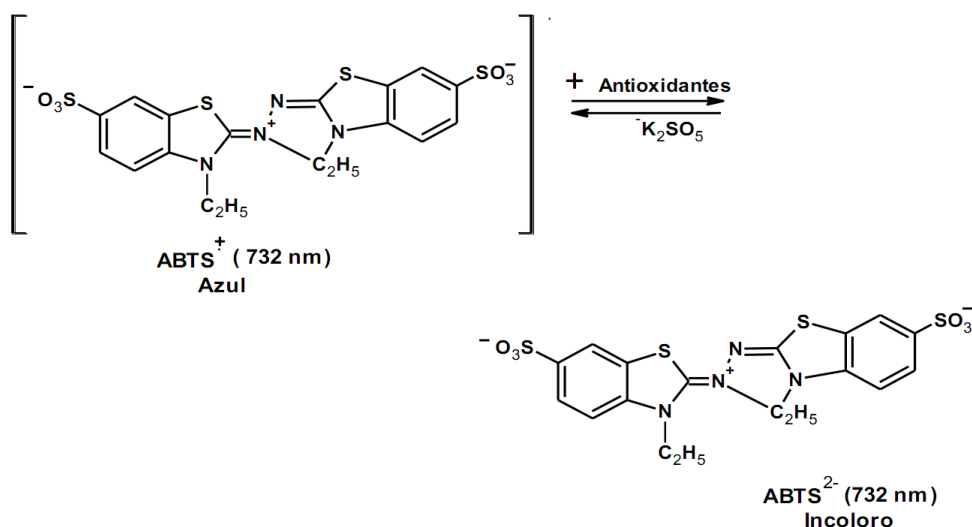


FIGURA N°18: Estructura del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante.⁹³

La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS, implica la producción directa del cromóforo ABTS verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm, tal como se muestra en la figura N°18. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.⁹⁴

2.12 Evaluación Sensorial en Carnes

Debido al progreso científico y tecnológico y en respuesta a la creciente demanda de productos de calidad por parte de los consumidores, las técnicas disponibles para la investigación científica para la evaluación cualitativa de los alimentos están aumentando. Además de los análisis físicos, químicos y microbiológicos tradicionales que establecen la salubridad y el valor nutricional de un alimento, las pruebas sensoriales son ampliamente utilizadas. Estas permiten caracterizar el perfil perceptible de un producto y resaltar su aceptación por parte del consumidor. A pesar de tener sofisticadas técnicas analíticas e instrumentales para la determinación de las características de los alimentos, estos, en realidad, solo pueden reemplazar parcialmente a los sensoriales.⁹⁵

El análisis descriptivo consiste en una fase preliminar, que implica el reclutamiento de un gran número de catadores, y de tres fases sucesivas: la generación de los atributos (identificación de las propiedades sensoriales del producto); capacitación en panel (para reconocer y medir estas características); análisis cuantitativo (medición del nivel de intensidad a la que se perciben las propiedades sensoriales del producto).

En comparación con otros productos alimenticios, el análisis sensorial de la carne presenta de las dificultades intrínsecas que deben mantenerse en cuenta, como: variabilidad de las características sensoriales entre cortes comerciales, variabilidad de las características sensoriales entre productos de animales sometidos al mismo tratamiento experimental y la variabilidad de las características presentes en la misma porción de carne, debido al tejido conectivo.

Debido a las peculiaridades del producto, también el entrenamiento del panel se caracteriza por una mayor complejidad y articulación de las fases en curso de entrenamiento es necesario para llevar a cabo una primera fase de tiempo para reconocimiento de los sabores básicos (salado, dulce, amargo y ácido) para evaluar la sensibilidad y la capacidad de discriminación de los panelistas individuales. Posteriormente es necesario llevar a cabo una segunda fase de entrenamiento para centrar la atención en los atributos específicos del producto a partir del cual depende de la aceptabilidad (olor, sabor, ternura, jugosidad, masticabilidad). Los propósitos del entrenamiento y para obtener diferentes niveles de intensidad para los atributos considerado, se utilizan diferentes combinaciones de cortes comerciales (para la masticación y la ternura) y diferentes tiempos (para la jugosidad) y las modalidades de cocinando (para olor y sabor).⁹⁶

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de Bromatología, Química Analítica Instrumental, Farmacología y Microbiología General de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Y también en los laboratorios de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2 Materiales, equipos, reactivos y soluciones

3.2.1 Materiales

- Matraces Erlenmeyer (100, 250 mL)
- Micropipetas BOECO (10 mL – 100 mL y 100mL - 1000 mL)
- Pipetas de vidrio (1, 2, 5, 10 mL)
- Probetas de vidrio (50, 100, 250 mL)
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitados de vidrio (50, 100, 250 mL)
- Placas petri de plástico de 90x15mm
- Frascos de vidrio (400 mL)
- Platos de poliestireno expandido (EPS)
- Film grado alimentario 30 cm x 1400 m

3.2.2 Equipos

- Balanza analítica OHAUS modelo PA224 (0.0001 g – 220 g)
- Espectrofotómetro GENESIS 10S UV - Visible
- Estufa Marca Memmert
- Potenciómetro Biolab PH5-3BW Microprocesador PH-MV-TEMPERATURE
- Refractómetro Milwaukee modelo MA871
- Refrigeradora Marca Samsung
- Autoclave ALP Co., Ltd. Modelo MC-30LDP
- Incubadora CJ, Modelo XMTD
- Horno Marca Memmert modelo 30 – 1060
- Colorímetro Minolta (CR-400)

3.2.3 Reactivos

- Ácido Clorhídrico (HCl)
- Reactivo Dragendorff
- Reactivo Gelatina 1% en solución salina
- Reactivos Fehling A y Fehling B
- Limaduras de Mg
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Reactivo Folin Ciocalteu Marca MERCK
- Carbonato de calcio
- Etanol Absoluto Marca CIMATEC
- Metanol Marca INDUQUIMICA S.R.
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox) Marca SIGMA-ALDRICH
- 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (BHT) Marca SIGMA-ALDRICH
- 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) Marca SIGMA-ALDRICH
- Persulfato de potasio
- 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) Marca SIGMA-ALDRICH
- Agar Plate Count Marca CONDA
- Agua Peptonada Marca MERCK
- Agua destilada

3.3 Métodos

3.3.1 Recolección de la muestra

Los frutos maduros de *Muehlenbeckia volcanica Benth. Endl.* “mullak’a”, se colectaron durante los meses de Octubre 2017 y Abril 2018 en el Centro Poblado Conin, distrito de Ponto, Provincia de Huari, departamento de Ancash.

La carne de alpaca de la empresa Alpaquel Perú S.A.C correspondiente al corte bife ancho de alpaca (*Longissimus thoracis*), fue transportada a una temperatura entre -18 a -22°C en paquetes de 750 gramos cada una, empacados al vacío. La carne procedió de alpacas machos, con rango de edad entre 18 a 24 meses, de raza Huacaya, pertenecientes al distrito de Marcapomacocha, provincia de Yauli, departamento de Junín.

3.3.2 Caracterización física del fruto

Se determinó el diámetro del fruto utilizando como instrumento un vernier. El peso promedio de los frutos se realizó con una balanza de precisión (modelo PA 224, Marca Ohaus, serie Pioneer), para lo cual se partió de un lote de 1 Kg de materia prima, la cual se dividió en 5 sub-lotes en función a su tamaño conformado por aproximadamente 200 g cada uno, en orden de tamaño de menor a mayor; de los cuales se tomó 20 unidades representativas para hallar el diámetro y peso promedio.

3.3.3 Caracterización Fisicoquímica del fruto

3.3.3.1 Humedad

La determinación se realizó por desecación en estufa a 130°C, durante 1 hora con previo pesado 2g de muestra siguiendo la metodología propuesta por la AOAC 925.10.⁹⁷

3.3.3.2 Proteínas

Se siguió la metodología sugerida por la AOAC 978.04, cuantificando el nitrógeno total por el método de Kjeldahl. Para lo cual se pesó 2 g de muestra y se sometió al proceso de digestión utilizando catalizadores de K₂SO₄, y soluciones de H₂SO₄, el arrastre por vapor es recepcionado con soluciones de NaOH para neutralizar la muestra. Por último, se tituló con HCl para para expresar la proteína en relación al nitrógeno presente en ella.⁹⁸

3.3.3.3 Carbohidratos

El contenido de carbohidratos se obtuvo “por diferencia”; es decir, sustrayendo de 100 la suma de proteínas, grasas, agua y cenizas.⁹⁹

$$\text{Carbohidratos Totales (g)} = 100 - (\text{proteína} + \text{grasa} + \text{agua} + \text{ceniza})$$

3.3.3.4 Grasa

La determinación se realizó por la técnica de extracción descrita por la AOAC 930.09, en el que se utilizó como solvente éter comercial, el cual inicialmente se lavó con porciones de agua, NaOH o KOH. Luego fue decantado con el fin de mantenerlo deshidratado con Na metálico. Posteriormente el reactivo se trabajó con 2 g de muestra usando un dedal que permitió el paso rápido del éter por gravimetría, el cual finalmente se extrae en seco durante 30 minutos a 100°C.⁹⁷

3.3.3.5 Cenizas

La determinación se realizó siguiendo la metodología AOAC 930.05 para lo cual se pesó 2 g de muestra en el crisol de porcelana y se colocó a una temperatura de horno controlado precalentado a 100°C hasta que se expulse el agua, luego se colocó la muestra a 600°C durante 2 horas y se transfirió el crisol directamente al desecador, se enfrió y se pesó inmediatamente, informando % de ceniza hasta el primer decimal.⁹⁸

3.3.3.6 Vitamina C

La vitamina C se determinó mediante titulación con 2,6-dicloroindofenol siguiendo la metodología de la AOAC 967.21, para esto se adicionó a la muestra su misma cantidad en solución extractora (ácido metafosfórico - ácido acético) y se mezcló bien. Se filtró con un embudo y papel filtro. Luego se tomó una alícuota de 2 mL del filtrado más 5 ml de ácido metafosfórico - ácido acético en un matraz Erlenmeyer, y se tituló con el indofenol hasta el vire rosa. El volumen registrado de titulación se le restó el gastado en el blanco.⁹⁷

3.3.3.7 Calcio, Hierro y Potasio

Los metales como el calcio, hierro y potasio se determinaron mediante el método de espectrometría de absorción atómica descrita en la AOAC 975.03, para lo cual se secó 1 g de muestra (2 horas a 500°C), se humedeció las cenizas con 10 gotas de H₂O, y se agregó cuidadosamente 3-4 ml de HNO₃ (1 + 1). Se evaporó el exceso de HNO₃ en una placa caliente a 100°C-120°C. Se devolvió el crisol al horno con la ceniza por 1 hora adicional a 500°C. Se enfrió el crisol y se disolvió la ceniza en 10 ml de HCl (1 + 1) y se transfirió a un matraz volumétrico de 50 ml. A la solución en un matraz volumétrico de 50 ml, se agregó 10 ml de solución al 5% (solución de lantano), y se aforó. Se dejó que la sílice se asiente y se decantó el sobrenadante. Se realizaron las diluciones necesarias con 10% de HCl para obtener soluciones dentro del rango del instrumento. Finalmente se configuró el instrumento según el metal a determinar.⁹⁷

3.3.3.8 Grados Brix

Los grados Brix fueron determinados mediante refractometría siguiendo la metodología de la AOAC 932.12, para lo cual se tomó una porción representativa de cada una de las muestras bien mezcladas, libres de semillas, y se colocó sobre los prismas del refractómetro de Milwaukee modelo MA871 Refractometer, procediéndose a leer directamente sobre la escala del porcentaje de azúcares.⁹⁷

3.3.3.9 pH

La medición del pH fue por el método potenciométrico, para lo cual se calibró el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras de pH=4, pH=7 y pH=11. Luego se pesó 10 g de muestra y se transfirieron a un vaso de precipitado de 250 ml para añadir 90 ml de agua destilada. Se mezcló durante 10 minutos y se dejó reposar la solución durante 30 minutos. Finalmente se sumergió el electrodo en la solución. Se obtuvo la medición de pH y de la temperatura.¹⁰⁰

3.3.3.10 Acidez

La acidez fue determinada por titulación siguiendo la metodología descrita por la NTP 203.070. Cada una de las muestras fue sometida a mediciones por triplicado. La acidez se determinó mediante la aplicación de volumetría ácido-base con una solución NaOH (0.1N) en presencia del indicador fenolftaleína, hasta el cambio de viraje. La acidez fue expresada como porcentaje de ácido cítrico.¹⁰¹

3.3.4 Obtención del Extracto Natural

Se pesaron 60 g del fruto de “mullak’a” previamente lavado y desinfectado, y se sometió a extracción con 1 L de etanol al 80%. Se dejó macerar durante 15 días en un ambiente seco y oscuro con constante agitación manual. El extracto de un volumen de 1 L se concentró en estufa a 40°C hasta peso constante, se guardó en frasco de vidrio ámbar envuelto en papel aluminio para proteger de la luz, refrigerándose a 2°C. El rendimiento de la extracción fue de 16.7% (por cada 6 g de fruto se obtiene 1 g de extracto seco).

3.3.5 Caracterización fitoquímica del extracto del fruto de mullak’a

3.3.5.1 Alkaloides

Se determinó la presencia de alcaloides por medio de la reacción del reactivo de dragendorff (tetrayoduro de bismuto de potasio). Se colocó en un tubo de ensayo 2 ml de muestra, se añadió una gota del reactivo de dragendorff y se homogenizó, se acidificó la muestra añadiendo 0.5 ml de HCl 1N. La coloración positiva es anaranjado marrón.¹⁰²

3.3.5.2 Taninos

Se colocó 10 gotas de extracto en un tubo de ensayo y se añadió 2 gotas de solución de gelatina 1% en solución salina. El precipitado blanco, indica la presencia de taninos.¹⁰²

3.3.5.3 Flavonoides

La determinación se realizó mediante la reacción de Shinoda para lo cual se colocaron 20 gotas del extracto en un tubo de ensayo, se agregó de 2 a 3 virutas de Magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. Las coloraciones rojas indican preliminarmente la presencia de flavonas, la coloración roja a crimson, la presencia de flavonoles, y crimson a magenta, flavanonas; algunas veces azul o verde, también son consideradas positivas.¹⁰²

3.3.5.4 Azúcares Reductores

Se colocó en un tubo de ensayo 3ml de extracto y se añadió 1ml de solución de Fehling A (contiene CuSO₄) y 1ml de Fehling B (que contiene NaOH para alcalinizar el medio y permitir la reacción). Luego se calentaron los tubos en baño maría hasta que hiervan. La reacción fue positiva cuando la muestra se volvió de color rojo y fue negativa si quedó azul o cambia a un tono azul-verdoso.¹⁰³

3.3.5.5 Saponinas

Se utilizó el método de espuma para lo cual se diluyó el extracto en una proporción 9:1. Posteriormente se colocó en un tubo de ensayo 1 mL del extracto etanólico y 9 mL de H₂O destilada. Se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Se dejó reposar 15 min. Si la altura de espuma fue <5 mm: (-), se consideró negativa (no contiene saponinas); si fue alrededor de 5-10 mm, se consideró que la muestra posee un contenido moderado; y una altura >15 mm, se le atribuyó un alto contenido de saponinas.¹⁰⁴

3.3.5.6 Antocianinas

Ensayo ácido-base. En un vidrio de reloj se tomaron 5 gotas de extracto y se le agregaron 3 gotas de ácido clorhídrico, después para hacer la prueba a pH alcalino se agregó a otra muestra de extracto 3 gotas de hidróxido de sodio. Las antocianinas a pH ácido adoptaron colores en la gama de los rojos intensos y a pH básicos adquirieron colores intensos en la gama de los azules, verdes y amarillos.¹⁰⁵

3.3.6 Determinación de Polifenoles Totales

La determinación de polifenoles totales se realizó utilizando la metodología propuesta por Singleton y Rossi con algunas modificaciones.¹⁰⁶ Para lo cual se pesó 0.5 g tanto del fruto como del extracto y se llevó a un volumen final de 10 ml con etanol al 80%, se centrifugo por 30 minutos a 3000 rpm. Luego se realizaron diluciones con etanol al 80% hasta llegar a una concentración de 0.5 mg/ml para el extracto y 10 mg/ml para el fruto mullak'a. Se tomó 0.5 ml de muestra y se le adiciono 2.5 ml de Folin Ciocalteu 0.02N y posteriormente se le agregó 2 ml de carbonato de sodio al 7.5 %. Se llevó a incubar a 40°C por 20 minutos y después se dejó enfriar por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se leyó en el espectrofotómetro a 760nm. Las lecturas se realizaron por triplicado.

Se realizó una curva de calibración usando como estándar el ácido gálico. Para lo cual se preparó una solución stock de 400 µg/ml disolviendo 20 mg de ácido gálico en 50 ml de etanol al 80%, luego se prepararon diluciones con concentraciones de 20, 30, 40, 50, 70 µg/ml, con el fin de realizar la curva de referencia.

Para la preparación del blanco se tomó 0.5 ml de etanol al 80%, se le adicionó 2.5 ml de Follin Ciocalteu 0.02 N y luego 2 ml de carbonato de sodio al 7.5 %. Se leyó en el espectrofotómetro a 760 nm.

3.3.7 Determinación de actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante del extracto y del fruto por el método de decoloración con el radical catiónico ABTS (Ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y por el ensayo de decoloración de radicales DPPH (método del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).

Las pruebas de actividad antioxidante se realizaron según el método propuesto por Brand-Williams W. et al, empleando DPPH¹⁰⁷ y por Re, R. et al, empleando la capacidad antioxidante del trolox sobre el generador de radicales libres ABTS y su habilidad de secuestrar radicales de larga vida.⁹²

3.3.7.1 Metodología desarrollada para el ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH)

Preparación de las soluciones

Para la preparación del radical DPPH, se disolvió 2 mg de DPPH, en 100 mL de metanol grado reactivo. Posteriormente fueron preparadas soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 517 nanómetros.

Para la preparación del trolox, se partió de una solución stock de 400 µg/ml disolviendo 20 mg de trolox en 50 mL de etanol al 80%, luego se prepararon diluciones de 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 y 250 µg/ml con el fin de realizar la curva de referencia.

Para la preparación del BHT, se partió de una solución stock de 800 µg/ml disolviendo 40 mg de BHT en 50 mL de etanol al 80%, luego se prepararon diluciones de 25, 50, 150, 250, 500, 625, 750, 800 µg/ml con el fin de realizar la curva de referencia.

Para la preparación de las muestras de extracto de frutos de mullak'a, se preparó una solución stock de 6 mg/ml disolviendo 150 mg de extracto en 25 mL de etanol al 80%, luego se prepararon diluciones de 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3, 3.5 y 4 mg/ml con el fin de realizar la curva de referencia.

Para la preparación de la muestra de frutos de mullak'a, se preparó una solución stock de 30.5 mg/ml disolviendo 305 mg de fruto en 10 mL de etanol al 80%, luego se preparó una dilución de concentración de 7.6 mg/ml.

Preparación de la curva de referencia

A 975 µL del radical DPPH se le adicionó 25 µL de cada una de las diluciones de trolox, BHT, fruto y extracto; se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Cada muestra se preparó por triplicado. La medición se realizó a 517 nm, y el porcentaje de captación se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Captación DPPH} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100$$

El porcentaje de captación representó la pérdida del color púrpura a amarillo del radical DPPH, cuando le fue agregado un compuesto antioxidante, disminuyendo así la absorbancia de la solución, que es medida a 517 nm.

Se procedió a medir la absorbancia del DPPH (solo), la cual se conoce como absorbancia inicial, luego se procedió a realizar la mezcla entre el DPPH y las muestras, sobre la cual se realizó la evaluación de la actividad antioxidante.

TABLA N°7: Mezclas utilizadas para el método DPPH

	Blanco	Blanco de muestra del extracto	Patrón de referencia trolox	Patrón de referencia BHT	Muestra Extracto	Blanco de muestra del fruto	Muestra fruto
DPPH	975 µL		975 µL	975 µL	975 µL		975 µL
Etanol 80%	25 µL	975 µL				975 µL	
trolox (25, 50, 75, 100, 125, 200 y 250 µg/ml)			25 µL				
BHT (25, 50, 150, 250, 500, 625, 750, 800 µg/ml)				25 µL			
Extracto (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 y 4 mg/ml)		25 µL			25 µL		
Fruto (7.6 mg/ml)						25 µL	25 µL
TOTAL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL

3.3.7.2 Metodología desarrollada para el ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)

Preparación de las soluciones

Para la preparación del radical ABTS, se disolvió 77.6 mg de (ABTS) la sal diamónica del 2,2-Azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico) de Sigma-Aldrich, en 20 mL de agua desionizada, luego se adicionaron 13.2 mg de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), la solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 16 horas en oscuridad. Posteriormente se prepararon las soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 para todos los casos, a una longitud de onda de 734 nanómetros.

Para la preparación del trolox, se partió de una solución stock de 400 $\mu\text{g/ml}$ disolviendo 20 mg de trolox en 50mL de etanol al 80%, luego se prepararon diluciones de 15, 25, 50, 75, 100 y 125 $\mu\text{g/ml}$ con el fin de realizar la curva de referencia.

Para la preparación del BHT, se partió de una solución stock de 400 $\mu\text{g/ml}$ disolviendo 20 mg de BHT en 50mL de etanol al 80%, luego se prepararon diluciones de 5, 10, 30, 50, 100 y 125 $\mu\text{g/ml}$ con el fin de realizar la curva de referencia.

Para la preparación de las muestras de extracto de frutos de mullak'a, se preparó una solución stock de 6 mg/ml disolviendo 150 mg de extracto en 25 mL de etanol al 80%, luego se prepararon diluciones de concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/ml con el fin de realizar la curva de referencia.

Para la preparación de la muestra de frutos de mullak'a, se preparó una solución stock de 30.5 mg/ml disolviendo 305 mg de fruto en 10 ml de etanol al 80%, luego se preparó una dilución de concentración de 7.6 mg/ml.

Preparación de la curva de referencia

A 2900 μL del radical ABTS se le adicionaron 100 μL de cada una de las diluciones de trolox, BHT, fruto y de extracto. Se dejó reaccionar durante 7 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Cada muestra se preparó por triplicado. La medición se realizó a 734 nanómetros, y el porcentaje de captación se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de captación de ABTS} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100$$

El porcentaje de captación representa la pérdida del color azul-verde del radical ABTS, cuando le es agregado un compuesto antioxidante, disminuyendo así la absorbancia de la solución, que es medida a 734 nm.

Se procedió a medir la absorbancia del ABTS (solo), la cual se conoce como absorbancia inicial, luego se procedió a realizar la mezcla entre el ABTS y el extracto o la fracción, sobre la cual se realizó la evaluación de la actividad antioxidante.

TABLA N°8: Mezclas utilizadas para el método ABTS

	Blanco	Blanco de muestra del extracto	Patrón de referencia trolox	Patrón de referencia BHT	Muestra Extracto	Blanco de muestra del fruto	Muestra fruto
ABTS	2900 μ L		2900 μ L	2900 μ L	2900 μ L		2900 μ L
Etanol 80%	100 μ L	2900 μ L				2900 μ L	
trolox (15, 25, 50, 75, 100 y 125 μ g/ ml)			100 μ L				
BHT (5, 10, 30, 50, 100, 125 y 150 μ g/ml)				100 μ L			
Extracto (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 y 1.5 mg/ml)		100 μ L			100 μ L		
Fruto (7.6 mg/ml)						100 μ L	100 μ L
TOTAL	3000 μ L	3000 μ L	3000 μ L	3000 μ L	3000 μ L	3000 μ L	3000 μ L

3.3.8 Evaluación de parámetros de calidad de la carne de alpaca

3.3.8.1 Capacidad de retención de agua (CRA)

Se midió la capacidad de retención de agua (CRA) por el método de prensado. Se tomó aproximadamente 0.3 g de muestras, exactamente pesados (m_1). La muestra se colocó entre dos papeles filtro previamente desecados. A continuación, la muestra con el papel filtro se dispuso entre dos placas sobre las que se aplicó una presión de 10 kg durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se retiró el peso y se separó la muestra del papel, procurando eliminar cualquier resto de tejido que pudiera quedar adherido. El papel de filtro se pesó (m_2) para luego llevar a una estufa a 60°C donde se secó durante 24 horas. Luego del secado, el papel de filtro se pesó de nuevo (m_3). El valor obtenido fue expresado como gramos de agua retenida por cada 100 gramos de agua en la muestra según la siguiente ecuación.¹⁰⁸

$$\text{CRA (g H}_2\text{O retenida/100 g de H}_2\text{O)} = ((m_1 \times H) - (m_2 - m_3) \times 100) / (m_1 \times H)$$

Donde:

m_1 = masa de la muestra (g)

m_2 = masa del papel de filtro húmedo (g)

m_3 = masa de papel de filtro seco (g)

H = contenido de humedad de la muestra (g de H_2O /g de muestra)

3.3.8.2 Humedad

Para la determinación de la humedad se pesó 3 g (m_1) de muestra de carne de alpaca por triplicado, las muestras deben tener dimensiones semejantes. Estas muestras se colocaron en placas petri previamente secadas y pesadas (m_2). Luego se colocó las placas que contienen las muestras en un horno a 100-102 °C por 16-18 horas. Luego se enfrió en un desecador y pesó las placas cerradas (m_3). El valor obtenido fue g de H_2O en 100 g de muestra.¹⁰⁸

$$\%H = m_1 - (m_3 - m_2) / m_1 \times 100$$

Donde:

M_1 = peso de la muestra de carne

M_2 = peso de la placa Petri vacía

M3 = peso de placa Petri conteniendo la muestra luego del secado

3.3.8.3 pH

Para la determinación del pH de las muestras de carne de alpaca se pesó 30g de muestra y se mezcló con 100 ml de agua destilada. Luego se midió el pH de la suspensión con un pHmetro.¹⁰⁹

3.3.8.4 Pérdida de cocción

Las muestras de carne de alpaca se pesaron antes de cocinarlas y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente después de cocinarlas. Las muestras de carne se evaluaron y la pérdida de cocción se calculó de la siguiente manera.¹¹⁰

$$\text{Pérdida de cocción (gramo/100gramo)} = \frac{Wr - Wc}{Wr} \times 100$$

Donde:

Wr: el peso de la carne de alpaca cruda (g).

Wc: el peso de la carne de alpaca cocida (g).

3.3.8.5 Rendimiento de cocción

El rendimiento de cocción de diferentes muestras de carne de alpaca se midió restando la pérdida de cocción de 100.

3.3.8.6 Encogimiento

El cambio en la longitud de la carne de alpaca (contracción) se midió en muestras cocidas usando las siguientes ecuaciones.¹¹¹

$$\% \text{Contracción} = \frac{\text{longitud sin cocer (cm)} - \text{longitud cocidos (cm)}}{\text{longitud sin cocer (cm)}} \times 100$$

3.3.9 Acondicionamiento de la carne de alpaca para cada tratamiento

Las muestras fueron acondicionadas para cada tratamiento siguiendo las BPM, para lo cual se desinfectó todos los utensilios con hipoclorito de sodio a 200 ppm. Luego se procedió a moler la carne de alpaca para conseguir una mayor uniformidad al aplicar cada tratamiento. Las muestras control fueron aquellas que no se les adicionó ningún antioxidante. Las muestras con el tratamiento de BHT fueron acondicionadas tomando en cuenta la cantidad de BHT permitida por el Codex Alimentario, para carnes procesadas o trituradas, el cual es de 100 mg/kg de carne. Y finalmente se acondicionó el tratamiento con extracto del fruto de mullak'a utilizando una concentración de 862 mg de extracto por kg de carne molida.

Las muestras control, con BHT y con extracto de frutos de mullak'a fueron colocadas en porciones de 100 gramos en platos de poliestireno expandido y cubiertas con film grado alimentario, simulando la presentación de los supermercados. Las muestras fueron refrigeradas con una temperatura promedio de 2°C.

3.3.9.1 Cálculos de equivalencia y capacidad antioxidante

El extracto del fruto de mullak'a y el BHT fueron analizados para determinar su capacidad antioxidante utilizando el método DPPH y ABTS. Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se obtuvieron mediante el uso de curvas de calibración estándar, expresadas como µg de trolox / mL.

La cantidad de extracto del fruto de mullak'a se estimó mediante cálculos basados en los resultados de los dos métodos colorimétricos utilizados para determinar la capacidad antioxidante, de manera similar a la usada por Fernandes *et al.*¹¹² La concentración de extracto del fruto de mullak'a para la aplicación en la carne molida de alpaca se definió mediante cálculos de conversión para proporcionar una actividad antioxidante equivalente a 100 ppm de BHT, cantidad que recomienda el Codex Alimentario en la industria cárnica, según se analiza mediante los métodos colorimétricos DPPH y ABTS. Los resultados se obtuvieron en ppm, que se convirtieron en ml / kg de producto cárnico. Los métodos proporcionaron diferentes valores para el extracto del fruto de mullak'a; 450 y 862 mg / kg de producto cárnico, según lo determinado por DPPH y ABTS, respectivamente. Para los cálculos de conversión, se consideraron todas las diluciones hechas durante la obtención del extracto (maceración, centrifugación, filtración, secado y reconstitución en agua estéril).

Finalmente se usó la concentración de extracto hallada mediante la metodología ABTS ya que en estudios preliminares presento mejores resultados sensoriales y de pH, además de ser según Kuskoski *et al*/ un método de elevada sensibilidad y muy estable en comparación al método DPPH.¹¹³ (Ver anexo 12)

3.3.10 Formación del panel sensorial

3.3.10.1 Análisis descriptivo

El estudio se realizó en seis sesiones de 20 a 60 min. Las muestras fueron codificadas con números aleatorios de tres dígitos y se presentaron en forma monódica, siguiendo un orden equilibrado de presentación para evitar sesgos. Las evaluaciones se realizaron en un laboratorio con las condiciones adecuadas para el análisis de los participantes. Se usó agua mineral para eliminar sabores percibidos anteriormente por los evaluadores.

3.3.10.2 Reclutamiento de candidatos

Las actividades de preselección se iniciaron mediante una convocatoria dirigida a los estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se les invitó a participar como posibles integrantes de un panel sensorial y se les indicó que estuviesen atentos a la publicación de un aviso con la fecha a partir de la cual se les entregaría una encuesta.

En seguida se publicó un aviso invitando a los interesados a completar un formato de encuesta. Conforme fueron recibidos los formatos de encuesta, se realizaron las respectivas entrevistas personales las cuales consistieron en una conversación orientada a: establecer disponibilidad de tiempo, interés, motivación y estado de salud; y también informar sobre las actividades próximas a realizar.

3.3.10.3 Selección de candidatos

La proyección se llevó a cabo en tres etapas secundarias: reconocimiento de sabores básicos (RSB), reconocimiento de olores básicos (ROB) y análisis secuencial de Wald (SAW).

Para el RSB, se prepararon diferentes soluciones para el reconocimiento de sabores dulce, salado, umami, amargo y ácido. Las soluciones se presentaron en vasos desechables de 50 ml codificados. Los candidatos con $\geq 75\%$ de las respuestas correctas fueron seleccionados para la siguiente etapa.

Para el ROB se utilizaron la canela, orégano, pimienta, comino, palillo y ajo en polvo para generar diferentes olores y se presentaron en tubos ámbar de 15 ml. Los candidatos recibieron las muestras codificadas, y se les pidió que los identificaran y relacionaran. Candidatos con $\geq 65\%$ de identificación correcta pasaron a la siguiente etapa.¹¹⁴

Los candidatos que pasaron satisfactoriamente estas pruebas fueron sometidos a pruebas discriminativas para evaluar su capacidad de distinguir diferencias entre productos similares. Para ello se emplearon pruebas triangulares por ser sencillas, fáciles de aplicar y dar resultados objetivos. Además de ser recomendables para la selección de panelistas descriptivos al permitir diferenciar el producto por medio de cambios en sabor o textura. Se realizaron 6 sesiones de selección con 4 pruebas triangulares en cada una de ellas. Se emplearon distintos sabores de bebidas, galletas, panes, productos lácteos y embutidos. Ello debido a que no todos los candidatos tienen la misma capacidad discriminativa para un tipo de alimento, disminuyendo así un posible error de selección. A cada candidato se le entregaron tres muestras codificadas (números aleatorios de 3 dígitos), conteniendo un tipo de alimento presentado en vasos plásticos descartables de 3 onzas o platos, acompañados de un vaso de agua de mayor capacidad (5 onzas). Para evitar un error inducido por la expectación de los alimentos, éstos fueron distribuidos durante las sesiones de tal manera que las parejas presentadas nunca fueran iguales. Para evitar errores por posición al servir las muestras, éstas se presentaron en un arreglo completamente balanceado de manera que cada muestra de un alimento ocupara todas las posiciones posibles.

La selección de los jueces a partir de los resultados puede apoyarse en distintos criterios: (1) Porcentaje de Aciertos; (2) Comparación de la Habilidad Discriminatoria y (3) Análisis Secuencial. En la presente tesis el criterio de selección fue el Análisis Secuencial, ya que permitió clasificar a los candidatos como aceptables, rechazables o no definidos mediante un número mínimo de pruebas.

Los parámetros del análisis de Wald fueron: $\alpha = 0.05$ (probabilidad de aceptar un juez que debe ser rechazado); $\beta = 0.05$ (probabilidad de rechazar un juez que debe ser aceptado); $p_0 = 0.45$ (porcentaje máximo de fallos de un juez para ser rechazado) y $p_1 = 0.70$ (porcentaje mínima de aciertos exigible de un juez para ser aceptado). Líneas de aceptación y rechazo fueron $d_0 = 2.809 + 0.578n$ y $d_1 = -2.809 + 0.578n$, respectivamente.¹¹⁴

3.3.10.4 Entrenamiento de panelistas

El entrenamiento de 16 candidatos seleccionados consistió en familiarizarlos con la metodología sensorial específica, así como para incrementar la habilidad individual y mejorar la sensibilidad y la memoria. El entrenamiento se estructuró en 4 fases:

Fase Preliminar: En esta fase se impartieron los conceptos básicos necesarios para un buen desempeño en el estudio. Se incluyeron conceptos relacionados con la percepción, la cuantificación mediante escalas, tipos de lenguajes descriptivos y pruebas sensoriales. Esta información sirvió de base para desarrollar un vocabulario que permitió entender mejor los términos empleados en las siguientes fases del entrenamiento.

Primera Fase: Se evaluó en varias sesiones la variación de los atributos motivo de estudio: color, olor, consistencia y aspecto general.

Segunda Fase: El objetivo de esta fase fue lograr un manejo eficaz, consistente y confiable de las escalas.

Tercera Fase: El objetivo principal de esta fase fue el desarrollo de la ficha de evaluación a utilizar en el estudio definitivo, para lo cual se estableció una escala adecuada para cada propiedad a evaluar. Así mismo se establecieron alimentos referenciales de los extremos de la escala, para su mejor comprensión y uso.

3.3.10.5 Comprobación del desempeño

Luego del entrenamiento el panel pasó a realizar pruebas similares a las del estudio definitivo, para poder determinar la confiabilidad de los resultados que genera. En esta etapa se evaluó tanto la consistencia de cada panelista entre datos de una prueba a otra, así como su capacidad para distinguir diferencias entre las muestras. Con la finalidad de obtener datos suficientes para aplicar los respectivos diseños experimentales, el panel evaluó muestras de carne de res y muestras de carne de alpaca.

3.3.10.6 Evaluación Sensorial de los tratamientos

La evaluación sensorial de las muestras fue realizada en un laboratorio con luz natural, ambiente ventilado y en silencio. Los panelistas entrenados realizaron la evaluación sensorial de los atributos: aspecto general, color, olor y consistencia, de los tres tratamientos mantenidos en refrigeración (es decir tres tratamientos en cinco tiempos diferentes, dando un total de 15 muestras a evaluar). Se procedió a la presentación de las muestras en platos codificados con números aleatorios, en grupos de cinco para evitar saturar al panelista. Cada muestra estuvo acompañada de su respectiva ficha sensorial con las indicaciones a seguir. Para cada atributo se utilizó una escala no estructurada de 10cm y utilizando las anclas respectivas (es decir las muestras correspondientes a los extremos de cada atributo). La evaluación sensorial se realizó por duplicado, en días diferentes para comprobar la repetitividad de los resultados obtenidos.

Para la evaluación de los atributos sensoriales de la carne molida de alpaca se procedió con la siguiente metodología:

Aspecto general

Este atributo fue evaluado a partir de la primera impresión visual de la muestra tomando en cuenta las siguientes características: color, brillo (liberación de líquidos) y presencia de manchas. Este atributo es subjetivo ya que depende de las preferencias de cada panelista. Se utilizó una escala lineal no estructurada de 10 cm, la cual fue medida con una regla, para lo cual se tomó una puntuación de cero como un aspecto general malo y como 10 un aspecto general bueno.



FIGURA N°19: Escala no estructurada de 10cm utilizada para la evaluación del aspecto general.

Color

Para la evaluación del color de las muestra de carne se utilizaron como anclas las imágenes presentadas en la la figura N° .Se utilizó una escala lineal no estructurada de 10 cm, la cual fue medida con una regla, para lo cual se tomó una puntuación de cero a un color correspondiente a carne fresca y como 10 a un color correspondiente a carne en descomposición.

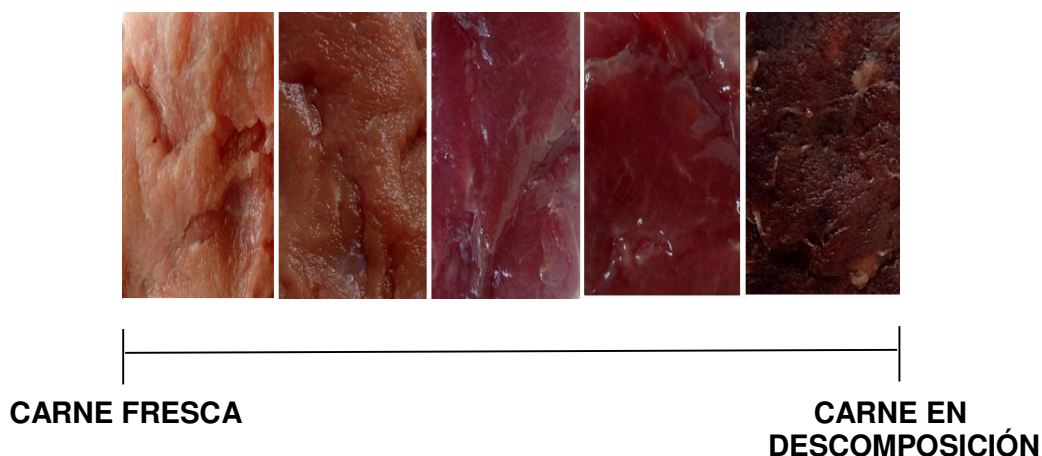


FIGURA N°20: Escala no estructurada de 10cm utilizada para la evaluación del color.

Consistencia

En la evaluación de la consistencia se utilizó el sentido de la vista y tacto, tomando en cuenta las siguientes características: resistencia a la presión (la cual fue evaluada por cada panelista mediante la presión con el dedo índice ejerciendo una fuerza determinada en el entrenamiento) y viscosidad. Se utilizó una escala lineal no estructurada de 10 cm, la cual fue medida con una regla, para lo cual se tomó una puntuación de cero a una consistencia correspondiente a carne fresca y como 10 a una consistencia correspondiente a carne en descomposición.



FIGURA N°21: Escala no estructurada de 10cm utilizada para la evaluación de la consistencia.

Olor

Este atributo fue evaluado por la percepción a través de la nariz de sustancias volátiles liberadas por la carne, en la evaluación del olor fue muy importante que no haya contaminación de un olor con otro, por tanto, los alimentos evaluados fueron mantenidos en recipientes herméticamente cerrados. Se utilizó una escala lineal no estructurada de 10 cm, la cual fue medida con una regla, para lo cual se tomó una puntuación de cero a un olor correspondiente a carne fresca y como 10 a un olor correspondiente a carne en descomposición.

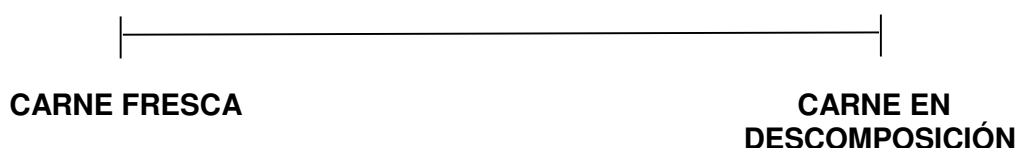


FIGURA N°22: Escala no estructurada de 10cm utilizada para la evaluación del olor.

3.3.11 Análisis Microbiológico:

Para el análisis de la calidad microbiológica de las distintas muestras de carne de alpaca molida, se realizó el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en los tres tratamientos y cinco tiempos señalados (0, 3, 6, 9 y 12 días) con la finalidad de encontrar hasta que día el recuento es aceptable.

3.3.11.1 Recuento de aerobios mesófilos (Método ICMSF)

La carne de alpaca al estar ya molida se procedió directamente a realizar la dilución 10^{-1} , para lo cual se pesó 10 gramos de muestra representativa de carne de alpaca y se diluyó con 90 mL de agua peptonada. Luego se realizaron diluciones consecutivas de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} según fuera necesario dependiendo del recuento de tiempos previos. Para lo cual se tomó un 1mL de la dilución 10^{-1} y se le adicionó a 9 ml de agua peptonada, así sucesivamente hasta obtener la dilución requerida.

Se pipeteó por duplicado, en placas Petri, alícuotas de 1 ml de tres diluciones consecutivas. Agregar 20-25 ml de Agar Plate Count y realizan los movimientos necesarios con la finalidad de mezclar el inóculo con el medio. Una vez solidificado el agar se invirtieron las placas y se incubaron a 30°C durante 48 ± 3 horas.

Para el recuento en placa de aerobios mesófilos se eligieron dos placas correspondientes a una dilución que presenten entre 30 y 300 colonias. Contar todas las colonias de cada placa utilizando el contador de colonias y hallar la media aritmética de los dos valores y multiplicarla por el factor de dilución, dar el valor obtenido como el recuento estándar en placa.¹¹⁵

Por la ausencia de patrones microbiológicos en la legislación Peruana para la carne molida de Alpaca, fueron tomados como referencia los parámetros descritos en la **Norma Técnica Peruana 201.043: los Criterios microbiológicos para la carne de Alpaca**³⁴, a su vez contrastado con los parámetros estipulados en la **Norma Sanitaria: los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano** (criterio de carnes crudas, picadas y molidas).³⁵ Los recuentos bacterianos obtenidos fueron evaluados estadísticamente en Infostat utilizando la prueba de Tukey con nivel de significancia de 5% para determinar si existen diferencias significativas.

3.3.12 Determinación instrumental del color

La determinación instrumental del color se llevó a cabo en la carne de alpaca molida acondicionada para cada tratamiento y para cada tiempo de almacenamiento.

El color fue medido tres veces sobre la superficie de corte expuesta al aire usando el sistema CIELab con un colorímetro Minolta (CR-400) utilizando el iluminante D65 y 10° como ángulo del observador. Los parámetros de color de la escala CIELab estudiados fueron las coordenadas: luminosidad (L^*), componente rojo-verde (a^*) y componente amarillo-azul (b^*). Se siguió las recomendaciones de American Meat Science Association [AMSA]¹¹⁶ y por Honikel¹¹⁷, para la preparación de muestras y medida de las mismas.

IV. RESULTADOS

4.1 Características Físicas de fruto:

En la tabla N° 9 se presenta el resultado del diámetro promedio de veinte unidades de fruto de mullak'a seleccionados de forma representativa y del peso aproximado por fruto.

TABLA N°9: Diámetro y peso del fruto de mullak'a.

Diámetro promedio (mm) ± DS (n=20)	3.12 ± 0.336
Peso aproximado por unidad (mg) ± DS (n=3)	50.18 ± 0.025

4.2 Composición proximal

En la tabla N° 10 se presenta el resultado de la composición proximal que se le realizó al fruto de mullak'a, el cual comprende: Cenizas totales, Grasa cruda, Humedad, Proteína cruda y Carbohidratos. Además, se cuantificó los metales Calcio, Hierro y Potasio.

TABLA N°10: Composición proximal del fruto de *Muehlenbeckia volcanica*

Ensayo	Promedio ± DS (n=2)
Cenizas Totales (g/100g de muestra original)	0.90 ± 0.007
Grasa Cruda (g/100g de muestra original)	0.28 ± 0.014
Humedad (g/100g de muestra original)	80.52 ± 0.028
Proteína Cruda (g/100g de muestra original) (Factor: 6.25)	4.40 ± 0.021
Carbohidratos (g/100g de muestra original)	13.9 ± 0
Energía total (Kcal/100g de muestra original)	75.9 ± 0
Calcio (mg/100g de muestra original)	43.12 ± 0.014
Hierro (mg/100g de muestra original)	6.41 ± 0.064
Potasio (mg/100g de muestra original)	280.3 ± 0
Vitamina C (mg/100g de muestra original)	36.78 ± 0

4.3 Caracterización Fisicoquímica

4.3.1 Determinación de pH, acidez y Grados Brix del fruto mullak'a

En la tabla N° 11 se presenta el resultado del pH, acidez y grados Brix del fruto de mullak'a.

TABLA N°11: Determinación de pH, acidez y grados Brix del fruto de mullak'a

	Promedio \pm DS (n=3)
pH (T°=22)	4.33 \pm 0.012
Acidez total titulable (g/100g)	0.58 \pm 0.006
Grados Brix (T°=18.9)	23.39 \pm 0.032

4.3.2 Caracterización Fitoquímica del extracto del fruto de mullak'a:

En la tabla N° 12 se presenta el resultado de la caracterización fitoquímica del extracto del fruto mullak'a, el cual se realizó con el propósito de conocer los compuestos que posee el fruto, se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N°12: Caracterización fitoquímica del extracto del fruto de mullak'a

ENSAYO	RESULTADO
Alcaloides	-
Taninos	-
Flavonoides	+
Azucares Reductores	+
Saponinas	-
Antocianinas	+

- : Resultado negativo

+ : Resultado positivo

4.4 Determinación de Polifenoles Totales

En la tabla N° 13 se presenta las absorbancias en relación a la concentración de ácido gálico.

TABLA N°13: Absorbancias en relación a la concentración de ácido gálico

Concentración de ácido gálico (µg/ml)	Absorbancia Promedio ± DS (n=3)
7	0.642 ± 0.0015
5	0.503 ± 0.0015
4	0.429 ± 0.0020
3	0.358 ± 0.0050
2	0.283 ± 0.0015

En la tabla N° 14 se presenta la concentración de polifenoles totales obtenida tanto para el fruto como para el extracto.

TABLA N°14: Concentración de ácido gálico en relación a la concentración de fruto y extracto de mullak'a

Muestra	Concentración (mg/ml)	Absorbancia Promedio ± DS (n=3)	Concentración de ácido gálico (µg/mg) Promedio ± DS (n=3)
Fruto	10	0.472 ± 0.0040	4.6 ± 0.05
Extracto	0.5	0.335 ± 0.0035	57.2 ± 0.91

De estos resultados expuestos en la tabla N° 14 se halló la concentración de ácido gálico en mg/100 gramos de muestra, siendo para el fruto 463 mg de ácido gálico/100 de fruto y para el extracto de 5722 mg/100 de extracto.

4.5 Determinación de actividad antioxidante mediante la metodología DPPH

En la tabla N° 15 se presenta los porcentajes de inhibición en relación a la concentración de trolox mediante el reactivo DPPH.

TABLA N°15: Porcentaje de inhibición en relación a la concentración de trolox mediante el reactivo DPPH

Concentración de trolox (µg/ml)	Absorbancia Promedio ± DS (n=3)	% de inhibición
6.3	0.144 ± 0.0040	87.7
5.0	0.282 ± 0.0061	67.5
3.8	0.369 ± 0.0029	54.8
3.1	0.455 ± 0.0327	42.4
2.5	0.512 ± 0	33.9
1.9	0.565 ± 0.0156	26.1
1.3	0.629 ± 0.0015	16.7
0.6	0.693 ± 0.0010	7.4
0.4	0.716 ± 0.0031	4.1

En la tabla N° 16 se presenta los porcentajes de inhibición en relación a la concentración de BHT mediante el reactivo DPPH.

TABLA N°16: Porcentaje de inhibición en relación a la concentración de BHT mediante el reactivo DPPH

Concentración de BHT (µg/ml)	Absorbancia Promedio ± DS (n=3)	% de inhibición
20.0	0.165 ± 0.0006	85.0
18.8	0.229 ± 0.0061	75.9
15.6	0.296 ± 0.0017	66.4
12.5	0.393 ± 0.0081	52.5
6.3	0.568 ± 0.0055	27.6
3.8	0.623 ± 0.0023	19.8
1.3	0.702 ± 0.0021	8.5
0.6	0.720 ± 0.0031	5.9

En la tabla N° 17 se presenta los porcentajes de inhibición en relación a la concentración de extracto de mullak'a mediante el reactivo DPPH.

TABLA N°17: Porcentaje de inhibición en relación a la concentración de extracto de mullak'a mediante el reactivo DPPH

Concentración de extracto (µg/ml)	Absorbancia Promedio ± DS (n=3)	% de inhibición
6.3	0.692 ± 0.0006	11.0
12.5	0.641 ± 0.0006	18.3
25.0	0.550 ± 0.0010	31.6
37.5	0.487 ± 0.0020	41.2
62.5	0.346 ± 0.0006	61.1
75.0	0.305 ± 0.0025	67.2
87.5	0.246 ± 0.0044	75.7
100.0	0.167 ± 0.0010	87.9

4.6 Determinación de actividad antioxidante mediante la metodología ABTS

En la tabla N° 18 se presenta los porcentajes de inhibición en relación a la concentración de trolox mediante el reactivo ABTS.

TABLA N°18: Porcentaje de inhibición en relación a la concentración de trolox mediante el reactivo ABTS

Concentración de trolox (µg/ml)	Absorbancia Promedio ± DS (n=3)	% de inhibición
4.2	0.112 ± 0.0010	91.4
3.3	0.213 ± 0.0012	76.9
2.5	0.337 ± 0.0021	59.0
1.7	0.440 ± 0.0006	44.1
0.8	0.578 ± 0.0035	24.1
0.5	0.612 ± 0.0012	19.1

En la tabla N° 19 se presenta los porcentajes de inhibición en relación a la concentración de BHT mediante el reactivo ABTS.

TABLA N°19: Porcentaje de inhibición en relación a la concentración de BHT mediante el reactivo ABTS

Concentración de BHT (µg/ml)	Absorbancia Promedio ± DS (n=3)	% de inhibición
4.2	0.104 ± 0.0047	92.7
3.3	0.222 ± 0.0040	75.6
1.7	0.436 ± 0.0010	44.9
1.0	0.554 ± 0.0012	27.9
0.3	0.644 ± 0.0015	15.0
0.2	0.680 ± 0.0020	9.8

En la tabla N° 20 se presenta los porcentajes de inhibición en relación a la concentración de extracto de mullak'a mediante el reactivo ABTS.

TABLA N°20: Porcentaje de inhibición en relación a la concentración del extracto de mullak'a mediante el reactivo ABTS

Concentración de extracto de mullak'a (µg/ml)	Absorbancia Promedio ± DS (n=3)	% de inhibición
1.7	0.663 ± 0.0038	11.3
3.3	0.617 ± 0.0006	18.1
8.3	0.531 ± 0.0006	30.6
16.7	0.412 ± 0.0012	47.7
25.0	0.283 ± 0.0031	66.4
33.3	0.159 ± 0.0021	84.4

4.7 Cálculo del IC₅₀ para las muestras de trolox, BHT y extracto de mullak'a utilizando las metodologías DPPH y ABTS.

Se utilizaron las ecuaciones de cada recta respectiva para cada muestra y se hallaron los IC₅₀, que es equivalente a la concentración necesaria para inhibir el radical en un 50%.

Como se observa en la Tabla N° 21, los IC₅₀ determinados por el método DPPH son mayores a los encontrados por la metodología ABTS, esto quiere decir que se necesitan menores concentraciones para inhibir en un 50% al radical ABTS.

TABLA N°21: Comparación de los IC₅₀ entre las metodologías DPPH y ABTS

MUESTRA	DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	ABTS IC ₅₀ (µg/ml)
Trolox	3.6	2.1
BHT	11.7	2.1
Extracto de mullak'a	52.7	18.1

4.8 Determinación de actividad antioxidante del fruto de mullak'a mediante el método DPPH

En la tabla N° 22 se presenta la concentración de trolox (µg trolox/mg de mullak'a) mediante el reactivo DPPH. Para lo cual se utilizó como referencia la curva de calibración del estándar trolox realizada con el método DPPH para la determinación de la actividad antioxidante.

TABLA N°22: Concentración de trolox en relación a la concentración de fruto mediante el reactivo DPPH

Muestra	Concentración (mg/ml)	Absorbancia Promedio ± DS (n=3)	% de inhibición	Concentración de trolox (µg/mg de mullak'a) Promedio ± DS (n=3)
Fruto	7.6	0.438 ± 0.0114	46.8	17.7 ± 0.61

4.9 Determinación de actividad antioxidante del fruto de mullak'a mediante el método ABTS

En la tabla N° 23 se presenta la concentración de trolox (μg trolox/mg de mullak'a) mediante el reactivo ABTS. Para lo cual se utilizó como referencia la curva de calibración del estándar trolox realizada con el método ABTS para la determinación de la actividad antioxidante.

TABLA N°23: Concentración de trolox en relación a la concentración de fruto mediante el reactivo ABTS

Muestra	Concentración (mg/ml)	Absorbancia Promedio \pm DS (n=3)	% de inhibición	Concentración de trolox ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de mullak'a) Promedio \pm DS (n=3)
Fruto	7.6	0.202 ± 0.0026	71.8	12.3 ± 0.07

4.10 Evaluación de parámetros de calidad del corte bife ancho de alpaca

En la tabla N° 24 se presenta los resultados obtenidos de los parámetros de calidad del corte bife ancho de alpaca

TABLA N° 24: Resultados de los parámetros de calidad del corte bife ancho de alpaca

Parámetro	Promedio \pm DS (n=3)
CRA (g de agua retenida / 100 g de agua)	72.9 ± 5.22
Perdida Por Presión (g de agua liberada / 100 g de agua)	27.1 ± 5.22
Humedad (%)	72.1 ± 0.31
pH	5.97 ± 0.002
Perdida por cocción (g/100g de carne)	22.7 ± 2.34
Rendimiento por cocción (%)	77.3 ± 2.34
Encogimiento del largo (%)	21.6 ± 5.32
Encogimiento del ancho (%)	21.5 ± 7.48

4.11 Evaluación sensorial

4.11.1. Preselección de panelistas

Las personas que completaron las encuestas fueron de 41. En base a la información consignada en las encuestas, se llamó a entrevista a un total de 29 personas, descartándose las restantes por su escasa disponibilidad de tiempo, criterio recomendado por Zook y Wessman.¹¹⁸ Luego de la entrevista, pasaron a la siguiente etapa las 29 personas convocadas ya que tenían conocimientos en el tema y tenían disponibilidad de tiempo e interés en el tema. Esta cantidad cumple con el número recomendado por Costell y Durán, para el inicio del proceso de selección de panelistas.¹¹⁹ La relación de candidatos preseleccionados se muestra en el Tabla N° 25.

TABLA N° 25: Lista de candidatos preseleccionados

NUMERO	NOMBRE
1	Stephany Romero
2	Diana Ordoñez
3	Soledad Sinco
4	Paula Tiburcio
5	Solange Guerrero
6	Margot Suarez
7	Paola Ojeda
8	Jhanin Ramírez
9	Michelle Quispe
10	Jessica Ortiz
11	Cinthia Marcatinco
12	Renzo Ruiz
13	Mary Cáceres
14	Maria Gastela
15	Ismael Cardenas
16	Natalia Sotomayor
17	Josilyn Bermúdez
18	Richard Castillo
19	Luis Villar
20	Erika Chaiña
21	Marc Anthony Hidalgo
22	Stephy Saavedra
23	Claudia Orlandini
24	Wendy Fernández
25	Stephany Suyón
26	Belén Ochoa
27	Jean Pierre Cárdenas
28	Guadalupe Olivas
29	Karina Aguilar

4.11.2. Selección de panelistas

Para la selección de panelistas se utilizaron las pruebas de sabores básicos y de olores básicos con el propósito de identificar a las personas que tengan un pobre sentido del gusto u olfato y/o también baja sensibilidad a diferencias de sabor y olores, además de proveer una experiencia sensorial preliminar.

El resultado de estas pruebas fue que 26 panelistas obtuvieron 100% y 3 panelistas 60% para la prueba de sabores básicos; y para la prueba de olores básicos 2 panelistas obtuvieron 100%, 9 panelistas 83%, 7 panelistas 67% y 11 panelistas porcentajes menores al 65%. Por lo tanto, de las 29 personas solo pasaron a las pruebas triangulares 17 panelistas.

Se prosiguió con una serie de pruebas discriminativas triangulares comprendidas en seis sesiones de aproximadamente 1 hora de duración cada una, en las que se realizaron de 3 a 4 pruebas por día, entre las 10:00 y 11:00 horas, de acuerdo con lo recomendado por Anzaldúa A.¹²⁰ Además según lo recomendó cada prueba discriminativa duró 10 minutos, haciendo un total de 40 minutos, luego de una introducción que tomó cerca de 15 minutos, al inicio de la sesión.

Los resultados de las pruebas discriminatorias triangulares se presentan en el Anexo 14.

Estos resultados fueron sometidos al Análisis Secuencial ya que tiene entre sus principales ventajas la aceptación de candidatos con gran habilidad discriminatoria y el rechazo de los poco hábiles en base a un reducido número de pruebas. Costell y Durán.¹¹⁹

En el anexo 14 se muestran los resultados de las respuestas correctas acumuladas sobre el total de las pruebas realizadas, las que sirvieron para la elaboración de las respectivas gráficas de análisis secuencial.

Los resultados correspondientes a la evaluación de cada uno de los candidatos se presentan en el anexo 14. En ellas se observa que los resultados de las respuestas correctas acumulativas de los panelistas se distribuyen entre las tres regiones: aceptación, rechazo e incertidumbre. A partir de ellas, se decidió si los candidatos eran seleccionados, eran rechazados o si se requería de más pruebas o un entrenamiento adicional para ser seleccionados.

En consecuencia, de los 17 candidatos que pasaron a las pruebas triangulares, 16 lograron cruzar la línea de aceptación, lo cual equivale a un porcentaje de aciertos mayor a 75 por lo que fueron automáticamente aceptados y 1 candidato se dio por vencido por falta de tiempo y no completó todas las sesiones. Los candidatos que se ubicaron en la zona de aceptación fueron: Stephany Romero, Solange Guerrero, Paola Ojeda, Janin Ramírez, Jessica Ortiz, Cinthia Marcatinco, Renzo Ruiz, Mary Cáceres, Maria Gastela, Ismael Cárdenas, Erika Chaiña, Wendy Fernández, Belén Ochoa, Soledad Sinco, Nathalia Sotomayor y Paula Tiburcio. Estos resultados se muestran en el anexo 14.

La decisión de aceptación de un panelista se estableció a través de los valores de la máxima habilidad inaceptable (P_0) y la mínima habilidad aceptable (P_1) y a los niveles de confiabilidad α y β recomendados por Durán y Calvo y Durán et al. Para el presente caso, equivale a:

- Tener un mínimo de 70% de aciertos para ser aceptado.
- Tener un máximo de 45% de aciertos para ser rechazado.
- Probabilidad de aceptar a un candidato rechazable (α) de 0.05.
- Probabilidad de rechazar a un candidato aceptable (β) de 0.05.

En consecuencia, los candidatos seleccionados para las etapas de entrenamiento (16 personas) fueron solamente aquellos cuyos resultados se ubicaron en la zona de aceptación, formando un panel de tamaño adecuado según lo que indican Costell y Duran¹¹⁹ y el IFT¹²¹.

4.11.3 Entrenamiento

4.11.3.1. Primera fase:

El resultado de esta fase consistió en realizar la identificación de las diferentes características sensoriales que describen a la carne de alpaca, los cuales son: color, olor, aspecto general y consistencia.

De esta manera, los panelistas se familiarizaron con la identificación de cada una de las características. Finalmente se realizó una discusión grupal de los resultados a fin de uniformizar criterios sobre los atributos mencionados.

4.11.3.2. Segunda fase:

A fin de alcanzar los objetivos de la Segunda Fase, se realizó una clase teórico-práctica donde se les explicó los tipos de escalas que existen para medir una propiedad sensorial, en qué se basan las escalas no estructuradas, el tipo de escala a utilizar en el estudio, así como la forma en que deberían usarla.

4.11.3.3. Tercera fase:

En la Tercera Fase, se les presentó la muestra en estudio para que evaluaran e identificaran las propiedades presentes en éste. Se presentaron dos tipos diferentes de muestras, siendo una de ellas la muestra a ser evaluada (carne de alpaca) y la otra una muestra similar (carne de res). Ello con el fin de que el panelista pudiera identificar con mayor facilidad aquellas propiedades que permiten discriminar entre productos de este tipo. Además, se les presentó a los panelistas la ficha de evaluación a utilizar en el estudio definitivo, para lo cual se estableció una escala no estructurada de 10cm para cada propiedad a evaluar. Así mismo se establecieron alimentos referenciales de los extremos de la escala, para su mejor comprensión y uso.

4.11.3.4. Comprobación del desempeño del panel

Luego del entrenamiento, en el cual los panelistas interiorizaron las definiciones de las propiedades a evaluar, los estándares relacionados a sus intensidades y la manera de utilizar las escalas, se procedió a realizar la comprobación del entrenamiento, mediante la evaluación del desempeño de los panelistas. Así, mediante el uso de pruebas estadísticas, se pudo identificar a los panelistas que realmente habían logrado una capacitación adecuada para dar resultados confiables y reproducibles.

En esta etapa se evaluaron dos tipos diferentes de muestras: una la muestra de carne de res y otra muestra de carne de alpaca. Esto debido a que es preferible que la evaluación del desempeño se haga con la muestra objetivo con el fin de asegurar que los panelistas están bien entrenados en la evaluación de sus propiedades y también para detectar si evalúan de manera diferente una segunda muestra.

La evaluación de más de un producto en esta prueba, tiene el objetivo de proporcionar una visión más completa de cómo se diferencian las propiedades del producto frente a un producto similar logrando juicios precisos sobre las diferencias relativas.

La repetición de las pruebas permite determinar la consistencia del panel y de los panelistas, así como aumentar la confiabilidad y validez de los resultados de la misma.

En el presente caso se optó por realizar 2 repeticiones: en la primera se evaluó los atributos de aspecto general y color en carne de res, y en la segunda se evaluó los atributos de olor y consistencia en carne de alpaca. Cada una de las pruebas se realizó en sesiones diferentes para evitar que los panelistas incurran en errores por fatiga y adaptación.

En la tabla N°26 se presentan los resultados de las dos pruebas de consistencia realizadas al panel sensorial entrenado.

TABLA N°26: Resultado de la prueba de consistencia

PANELISTAS	PUNTAJE			
	PRUEBA N°1	PRUEBA N°2		
	Aspecto General	Color	Olor	Consistencia
Renzo	2,50	7,60	2,00	5,00
Maria	0,80	8,30	1,40	5,70
Erika	7,40	7,50	2,90	6,10
Stefany	3,70	5,00	4,10	6,60
Wendy	1,90	2,60	5,00	5,30
Solange	7,90	4,00	5,90	6,40
Jessica	2,50	7,60	4,30	5,90
Belén	8,60	3,70	5,70	5,60
Cinthia	1,20	8,70	6,20	5,50
Ismael	4,20	8,00	2,60	5,80
Mary	4,50	6,20	3,90	6,00
Paola	2,80	2,60	2,90	5,00
Jhanin	5,00	7,40	6,10	6,20

En la tabla N°27 se muestran el análisis de varianza aplicado a la prueba de consistencia realizada a los panelistas entrenados para determinar cuáles son los que proporcionan datos más confiables y consistentes, y qué panelistas difieren en sus juicios con los del panel general y si los efectos de interacción panelista-muestra son significativos.

TABLA N° 27: Análisis de Varianza en la prueba de consistencia

Panelista	Medias	n	E.E
Paola	3.33	4	0.95 A
Wendy	3.70	4	0.95 A
María	4.05	4	0.95 A
Renzo	4.28	4	0.95 A
Stefany	4.85	4	0.95 A
Jessica	5.08	4	0.95 A
Ismael	5.15	4	0.95 A
Mary	5.15	4	0.95 A
Cinthia	5.40	4	0.95 A
Belén	5.90	4	0.95 A
Erika	5.98	4	0.95 A
Solange	6.05	4	0.95 A
Jhanin	6.18	4	0.95 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

El estudio de las varianzas individuales para cada una de las propiedades es un buen indicativo de la reproducibilidad de los panelistas y puede identificar aquellos que no usan la misma proporción de la escala estructurada en cada una de las repeticiones, emitiendo respuestas no constantes. La consistencia de los panelistas en sus respuestas es el factor más importante para determinar el buen entrenamiento de los mismos.

Como ayuda para identificar a los panelistas que diferían del resto del panel, se realizó, con los resultados anteriormente obtenidos, una comparación de medias, utilizando la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Estas comparaciones sirvieron de base para identificar panelistas inconsistentes que serían retirados del estudio.

De los análisis realizados anteriormente, se detectó que todos los panelistas eran aptos para proseguir con el estudio al proporcionar datos reproducibles y al ser consistente en sus calificaciones con el resto del panel en casi todas las propiedades del producto.

4.11.4. Evaluación sensorial de las muestras de carne de alpaca con los tres tratamientos para los cinco tiempos de almacenamiento refrigerado

Una vez que el panel estuvo plenamente entrenado demostrando consistencia y confiabilidad en sus observaciones, se procedió a realizar la prueba de evaluación sensorial para las muestras de carne de alpaca.

La evaluación de las muestras de estudio consistió en evaluar atributos de calidad como: aspecto general, color, consistencia, y olor, a tiempos de cero, tres, seis, nueve, y doce días, en muestras de carne de alpaca; las cuales se les presento; sin tratamiento, con tratamiento BHT y con extracto de mullak'a; de ese modo conocer si hay diferencia significativa entre las respuestas de los panelistas.

De la misma forma que en la comprobación del desempeño, los panelistas recibieron las muestras al mismo tiempo en platos debidamente codificados para que pudieran evaluar las propiedades en forma simultánea.

Los resultados de las repeticiones fueron promediados para cada una de las propiedades.

Sobre la base anterior, se realizó el análisis estadístico de los resultados adquiridos, para conocer si existe diferencia significativa hacia las tres distintas muestras en un mismo tiempo, respecto a cada atributo; quienes en la tabla N° 28, se presentan por superíndices numéricos, en la línea horizontal, así como también en la misma tabla N° 28, la diferencia significativa en los resultados para un mismo tratamiento en los cinco diferentes tiempos por cada atributo, presentados por superíndices alfabéticos en la línea vertical.

Tabla N°28: Efecto del tipo de Tratamiento y del tiempo de almacenamiento sobre los atributos sensoriales de la carne de alpaca

Atributo	Tiempo de Almacenamiento (Días)	Promedio \pm SD (n=13)					
		Control		Tratamiento con BHT		Tratamiento con mullak'a	
ASPECTO GENERAL	0	7.05 ^{a,b,3}	\pm 1.56	7.58 ^{b,3}	\pm 1.18	5.95 ^{a,3}	\pm 1.28
	3	4.86 ^{b,1,2}	\pm 1.58	5.68 ^{b,2}	\pm 1.82	3.31 ^{a,1}	\pm 1.18
	6	6.27 ^{a,2,3}	\pm 1.50	5.63 ^{a,2}	\pm 1.28	5.19 ^{a,2,3}	\pm 1.49
	9	6.04 ^{b,1,2,3}	\pm 1.51	4.18 ^{a,1,2}	\pm 2.25	4.79 ^{a,b,1,2,3}	\pm 1.86
	12	4.43 ^{a,1}	\pm 1.72	3.62 ^{a,1}	\pm 1.74	4.07 ^{a,1,2}	\pm 1.54
COLOR	0	2.92 ^{a,1,2}	\pm 1.55	2.22 ^{a,1}	\pm 2.07	3.67 ^{a,1}	\pm 1.27
	3	3.91 ^{a,1,2}	\pm 1.46	3.66 ^{a,1,2}	\pm 2.07	5.74 ^{b,2}	\pm 1.64
	6	2.83 ^{a,1}	\pm 0.83	4.09 ^{b,1,2}	\pm 1.24	3.84 ^{a,b,1}	\pm 1.56
	9	3.55 ^{a,1,2}	\pm 1.74	5.23 ^{a,1,2}	\pm 1.92	4.23 ^{a,1,2}	\pm 1.73
	12	4.40 ^{a,2}	\pm 1.20	5.58 ^{a,1,2}	\pm 1.55	4.72 ^{a,1,2}	\pm 1.97
CONSISTENCIA	0	2.98 ^{a,1,2}	\pm 1.57	2.98 ^{a,1}	\pm 1.30	3.12 ^{a,1}	\pm 1.65
	3	3.56 ^{a,1,2}	\pm 1.50	3.40 ^{a,1}	\pm 1.90	4.33 ^{a,1,2}	\pm 1.93
	6	2.71 ^{a,1}	\pm 1.53	4.24 ^{b,1,2}	\pm 1.77	4.20 ^{a,b,1,2}	\pm 1.41
	9	3.18 ^{a,1,2}	\pm 1.39	5.89 ^{b,2,3}	\pm 2.00	4.40 ^{a,b,1,2}	\pm 1.47
	12	4.68 ^{a,2}	\pm 1.88	6.27 ^{a,3}	\pm 1.80	5.59 ^{a,2}	\pm 1.29
OLOR	0	1.84 ^{a,1}	\pm 1.07	1.55 ^{a,1}	\pm 0.65	2.73 ^{b,1}	\pm 0.92
	3	2.93 ^{a,1}	\pm 1.21	3.32 ^{a,2}	\pm 1.22	3.11 ^{a,1}	\pm 0.91
	6	4.74 ^{a,2}	\pm 1.78	4.9 ^{a,3}	\pm 1.33	4.66 ^{a,2}	\pm 1.77
	9	6.63 ^{a,3}	\pm 1.01	6.63 ^{a,4}	\pm 1.20	6.90 ^{a,3}	\pm 1.24
	12	6.92 ^{a,3}	\pm 1.30	6.68 ^{a,4}	\pm 2.23	6.79 ^{a,3}	\pm 0.83

- a,b: valores medios de cada tipo de tratamiento en la misma fila (horizontal), no seguidos por una letra común, difieren significativamente ($p < 0.05$)
- 1,2,3: valores medios de cada tiempo de almacenamiento en la misma columna (vertical), no seguidos por un número común, difieren significativamente, con respecto al tiempo de almacenamiento ($P < 0.05$).

Se realizó el correspondiente análisis de varianza (ANOVA) en los tres tratamientos, para cada una de los atributos en diferentes tiempos. Las pruebas consistieron en determinar si existe o no diferencia significativa entre los mencionados tratamientos, y tiempos de almacenamiento de estos tres.

Para todos los casos en los que el ANOVA indico diferencia significativa, se procedió a identificar a las muestras diferenciadas por medio de la aplicación de la prueba de Tukey. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 28.

Con respecto a la apariencia general, se comprobó a través de la prueba de Tukey que no existen diferencias significativas entre las tres muestras de carne, para los días seis y día doce de almacenamiento; además se observa que existe diferencia entre los cinco tiempos de almacenamiento en un mismo tratamiento.

Para el caso del color, no existe diferencia significativa entre los tres “tratamientos” correspondientes al día cero, nueve y doce, pero si para el día tres y seis. Así mismo solo para el tratamiento con BHT dio como resultado que no hay diferencia significativa entre los cinco tiempos de almacenamiento.

En cuanto a la consistencia no existe diferencia significativa al contrastar las tres muestras que pertenecen a los días cero, tres y doce, mientras que si para las muestras del día seis y nueve. Sin embargo, al observar entre si los cinco tiempos de almacenamiento de un mismo tratamiento, si se observan diferencias significativas entre ellas.

Finalmente, para el atributo olor solo hay diferencia significativa entre los tres tratamientos del día cero, mientras que, entre las tres muestras de un mismo tiempo, no se detectaron diferencias, en tanto al comparar los cinco tiempos de un mismo tratamiento, resulto que si hay diferencia significativa.

Esta información ha permitido elaborar las figuras N° 23, 24, 25 y 26 donde se aprecia el nivel de respuesta para cada atributo en los diferentes tiempos de almacenamiento, de cada muestra.

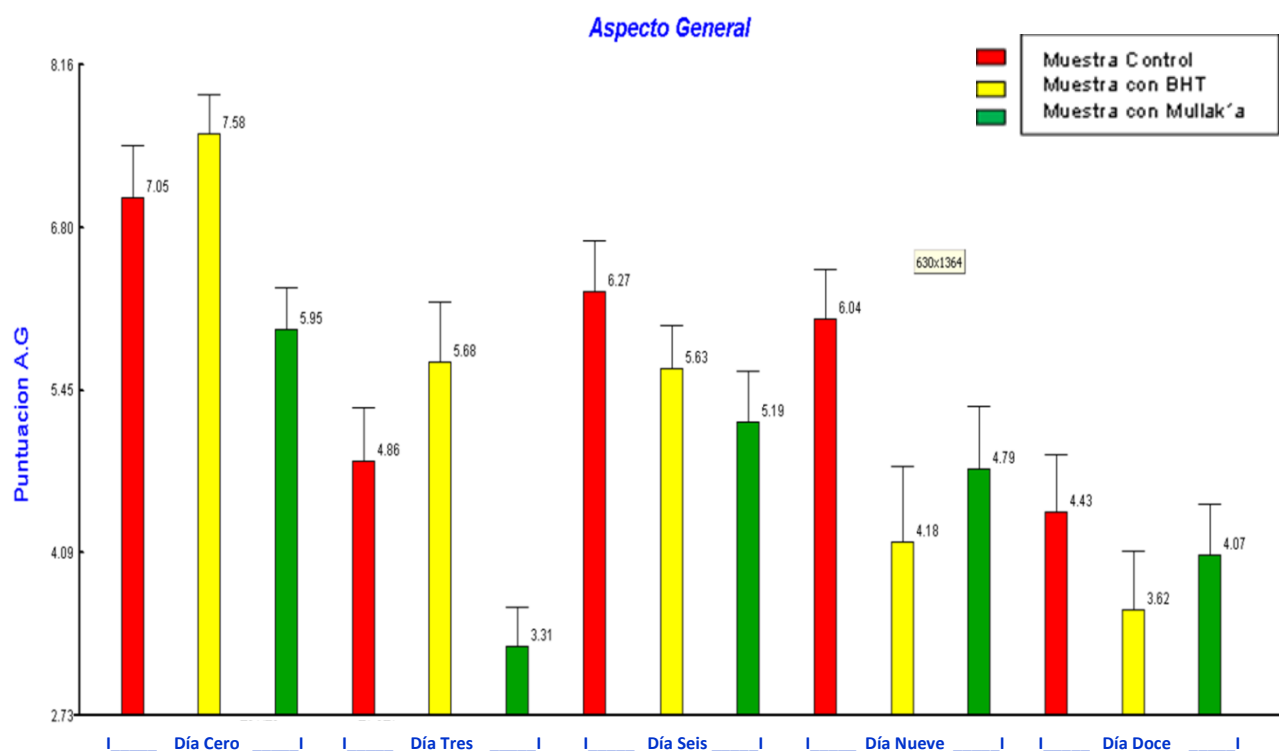


FIGURA Nº 23: Puntuación del Aspecto General de las tres muestras, en cada uno de los cuatro tiempos

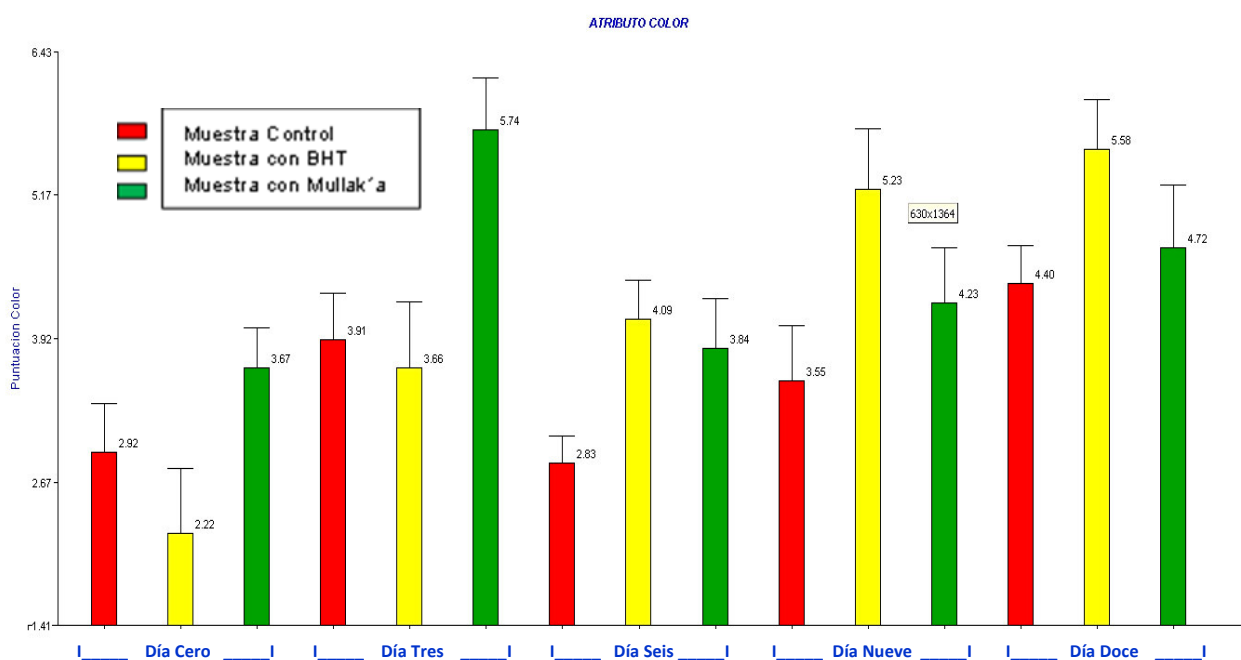


FIGURA Nº 24: Puntuación del Atributo Color de las tres muestras, en cada uno de los cuatro tiempos

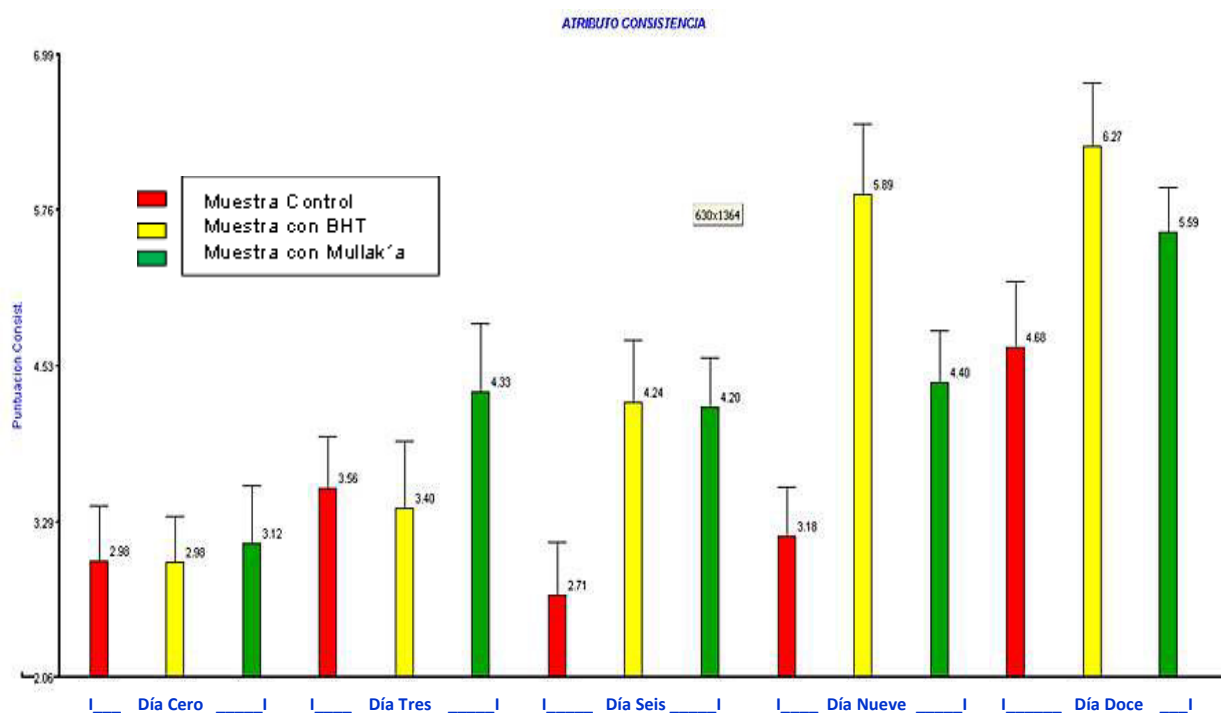


FIGURA Nº 25: Puntuación del Atributo Consistencia de las tres muestras, en cada uno de los cuatro tiempos

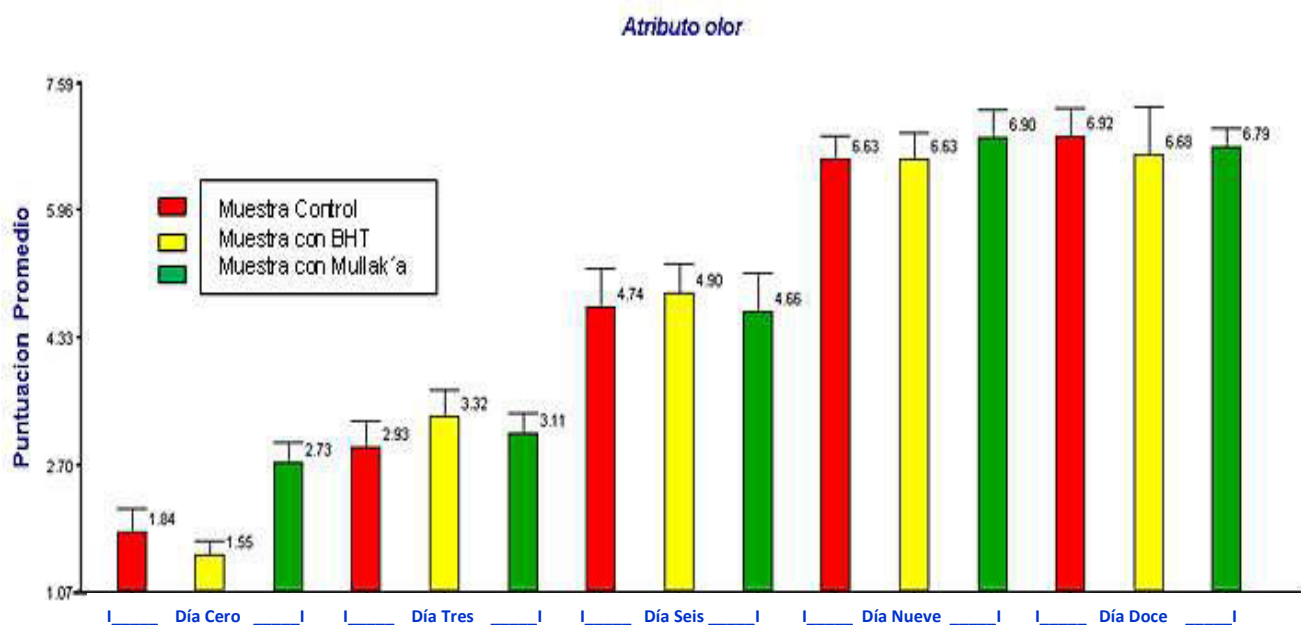


FIGURA Nº 26: Puntuación del Atributo Olor de las tres muestras, en cada uno de los cuatro tiempos

4.12 Análisis Microbiológico

En la tabla N° 29 se muestran los resultados del recuento de bacterias mesófitas aerobias (BMA) realizado para los tres tratamientos a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de almacenamiento refrigerado.

TABLA N°29: Resultado del recuento de bacterias mesófitas aerobias (BMA) Log₁₀ UFC/g de muestra

Tiempo de Almacenamiento (Días)	Promedio \pm SD (n=2)					
	Bacterias Mesofilas Aerobias Log ₁₀ UFC/g					
	Control		Tratamiento con BHT		Tratamiento con mullak'a	
0	3.87 ^{a,1}	\pm 0.13	4.34 ^{b,1}	\pm 0.14	3.88 ^{a,1}	\pm 0.02
3	7.71 ^{a,2}	\pm 0.01	8.10 ^{b,2}	\pm 0.03	8.04 ^{b,2}	\pm 0.01
6	9.04 ^{a,3}	\pm 0.00	9.53 ^{b,3}	\pm 0.08	9.43 ^{b,3}	\pm 0.03
9	9.56 ^{a,b,4}	\pm 0.18	9.99 ^{b,4}	\pm 0.02	9.32 ^{a,4}	\pm 0.00
12	9.54 ^{a,4}	\pm 0.04	9.63 ^{a,3}	\pm 0.01	9.57 ^{a,5}	\pm 0.03

- a,b: valores medios de cada tipo de tratamiento en la misma fila, no seguidos por una letra común, difieren significativamente ($p < 0.05$)
- 1,2,3: valores medios de cada tiempo de almacenamiento en la misma columna, no seguidos por un número común, difieren significativamente, con respecto al tiempo de almacenamiento ($P < 0.05$).

Para los tres tipos de muestras de carne, los conteos de bacterias mesófilas aerobias correspondiente al día 0, se encontraron dentro del límite permitido por la Norma Técnica Peruana 201.043, y **Norma Sanitaria de DIGESA** para carne molida, quienes reportan un máximo de 6.0 en Log₁₀ UFC/g (1 000 000 UFC/g) y un máximo de 7.0 en Log₁₀ UFC/g (1 0 000 000 UFC/g), respectivamente, mientras que a partir del día tres todas las muestras excedieron este límite (tabla N° 29). A través del tiempo se identificó un mayor crecimiento en las muestras con extracto de mullak'a y adición de BHT, respecto a la muestra control.

4.13 Determinación del pH

Se realizó la determinación del pH por triplicado en los tres tratamientos para los cinco tiempos, en los cuales se evidencia que a medida que el tiempo avanza el pH de las muestras comienza a incrementarse. Al finalizar los 12 días de tratamiento las muestras que presentan un mayor pH son aquellas muestras de carne de alpaca con tratamiento de BHT. Los resultados se detallan a continuación.

Se realizó el correspondiente análisis de varianza (ANOVA) en los tres tratamientos, para los diferentes tiempos. Las pruebas consistieron en determinar si existe o no diferencia significativa entre los mencionados tratamientos, y tiempos de almacenamiento de estos tres.

Para todos los casos en los que el ANOVA indico diferencia significativa, se procedió a identificar a las muestras diferenciadas por medio de la aplicación de la prueba de Tukey. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 30.

En los resultados obtenidos se puede evidenciar que existe diferencia significativa entre al menos dos de los tratamientos en todos los tiempos a excepción del sexto día, en el cual no hay diferencia significativa entre los tres tratamientos. También se observa que entre los cinco tiempos de almacenamiento de un mismo tratamiento en cuanto a los tres primeros días de almacenamiento no hay diferencias significativas en el pH.

TABLA N°30: Efecto del tipo de Tratamiento y del tiempo de almacenamiento sobre el pH de la carne de Alpaca.

	Tiempo de Almacenamiento (Días)	Promedio \pm SD (n=3)					
		Control		Tratamiento con BHT		Tratamiento con mullak'a	
pH	0	5.57 ^{a,1}	\pm 0.03	5.61 ^{a,b,1,2}	\pm 0.01	5.62 ^{b,1}	\pm 0.01
	3	5.63 ^{c,1,2}	\pm 0.01	5.53 ^{a,1}	\pm 0.01	5.58 ^{b,1}	\pm 0.01
	6	5.66 ^{a,1,2}	\pm 0.02	5.92 ^{a,2,3}	\pm 0.16	5.78 ^{a,1,2}	\pm 0.15
	9	5.78 ^{a,2}	\pm 0.03	6.05 ^{b,3}	\pm 0.13	5.99 ^{b,2}	\pm 0.03
	12	6.60 ^{a,b,3}	\pm 0.16	6.91 ^{b,4}	\pm 0.17	6.47 ^{a,3}	\pm 0.18

- a,b,c: valores medios de cada tipo de tratamiento en la misma fila, no seguidos por una letra común, difieren significativamente ($p < 0.05$)
- 1,2,3,4: valores medios de cada tiempo de almacenamiento en la misma columna, no seguidos por un número común, difieren significativamente, con respecto al tiempo de almacenamiento ($P < 0.05$).

4.14 Determinación instrumental del color

La determinación instrumental del color se llevó a cabo en la carne de alpaca molida acondicionada para cada tratamiento y para cada tiempo de almacenamiento, obteniendo los siguientes resultados.

Se realizó el correspondiente análisis de varianza (ANOVA) en los tres tratamientos, para los diferentes tiempos. Las pruebas determinaron si existe o no diferencia significativa entre los mencionados tratamientos, y tiempos de almacenamiento.

Para todos los casos en los que el ANOVA indico diferencia significativa, se procedió a identificar a las muestras diferenciadas por medio de la aplicación de la prueba de Tukey. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 31.

De los resultados obtenidos se observa que para el parámetro de color L^* existe diferencia significativa entre los tratamientos solo hasta el tercer día de almacenamiento refrigerado, luego del sexto día de almacenamiento en adelante no hay diferencia significativa entre los tratamientos. Así mismo solo para las muestras control dio como resultado que no hay diferencia significativa entre los cinco tiempos de almacenamiento.

En el caso del parámetro de color a^* existe diferencia significativa entre los tratamientos hasta el noveno día de almacenamiento, mientras que en el doceavo día de almacenamiento no hay diferencia significativa entre los tratamientos. Sin embargo, al observar entre si los cinco tiempos de almacenamiento de un mismo tratamiento, si se observan diferencias significativas entre ellos.

Para el parámetro de color b^* existe diferencia significativa entre los tratamientos en todos los tiempos de almacenamiento a excepción del sexto día, en el cual no se evidencia una diferencia significativa entre los tratamientos. Así mismo se puede evidenciar que entre los cinco tiempos de almacenamiento de un mismo tratamiento existen diferencias significativas resaltando que en el caso del BHT entre el día cero y el tercer día no hay diferencia significativa entre el mismo tratamiento; al igual que entre el sexto, noveno y tercer día del tratamiento con BHT no existe diferencias significativas para este parámetro de color.

TABLA N°31: Efecto del tipo de Tratamiento y del tiempo de almacenamiento sobre los parámetros de color de la carne de Alpaca

Tiempo de Almacenamiento (Días)		Promedio \pm SD (n=3)							
		Control				Tratamiento con BHT		Tratamiento con mullak'a	
L*	0	42.70 ^{a,b,1}	\pm	0.63		44.28 ^{b,3}	\pm 1.02	42.05 ^{a,1,2}	\pm 0.36
	3	42.66 ^{a,1}	\pm	0.03		44.87 ^{b,3}	\pm 0.34	42.61 ^{a,1,2}	\pm 0.17
	6	40.98 ^{a,1}	\pm	0.52		42.47 ^{a,1,2}	\pm 0.51	42.02 ^{a,1,2}	\pm 1.01
	9	43.07 ^{a,1}	\pm	0.90		43.97 ^{a,2,3}	\pm 0.37	43.38 ^{a,2}	\pm 0.74
	12	43.65 ^{a,1}	\pm	2.00		42.22 ^{a,1}	\pm 0.36	40.85 ^{a,1}	\pm 1.19
a*	0	10.89 ^{a,3}	\pm	0.12		13.08 ^{b,2,3}	\pm 0.74	10.37 ^{a,3}	\pm 0.12
	3	7.05 ^{a,1}	\pm	0.23		11.55 ^{c,1,2}	\pm 0.45	8.58 ^{b,1}	\pm 0.12
	6	12.13 ^{b,4}	\pm	0.48		13.55 ^{c,3}	\pm 0.07	9.96 ^{a,2,3}	\pm 0.50
	9	9.48 ^{a,2}	\pm	0.11		14.42 ^{b,3}	\pm 0.50	9.23 ^{a,1,2,3}	\pm 0.54
	12	9.67 ^{a,2}	\pm	0.58		10.37 ^{a,1}	\pm 0.82	8.83 ^{a,1,2}	\pm 0.69
b*	0	8.90 ^{b,1,2}	\pm	0.24		9.22 ^{b,2}	\pm 0.77	7.35 ^{a,3}	\pm 0.11
	3	9.25 ^{c,2}	\pm	0.24		8.64 ^{b,2}	\pm 0.13	7.32 ^{a,3}	\pm 0.06
	6	7.47 ^{a,1,2}	\pm	1.12		5.89 ^{a,1}	\pm 0.83	5.80 ^{a,2}	\pm 0.26
	9	8.99 ^{b,2}	\pm	0.63		5.98 ^{a,1}	\pm 0.23	5.53 ^{a,1,2}	\pm 0.71
	12	7.10 ^{b,1}	\pm	0.76		5.99 ^{b,1}	\pm 0.29	4.11 ^{a,1}	\pm 0.94

- a,b,c: valores medios de cada tipo de tratamiento en la misma fila, no seguidos por una letra común, difieren significativamente ($p < 0.05$)
- 1,2,3,4: valores medios de cada tiempo de almacenamiento en la misma columna, no seguidos por un número común, difieren significativamente, con respecto al tiempo de almacenamiento ($P < 0.05$).

A partir de los resultados de parámetros de color de la tabla N° 31 fueron calculadas las coordenadas C* (croma o saturación), Hue o tono (H*) y la diferencia de color Euclídea (ΔE) entre el día 1 y día 12 de almacenamiento refrigerado, poniendo en evidencia que existe diferencia del color de las muestras (control, con BHT, con extracto de mullak'a) del tiempo cero y las del doceavo día; obteniendo los siguientes resultados.

En la tabla N°32 se exponen los parámetros de color C* y H* de los tres tratamientos en almacenamiento refrigerado.

TABLA N° 32: Parámetros de color C* y H* de la carne de alpaca control, con BHT y con el extracto del fruto de mullak'a en almacenamiento refrigerado.

	Tiempo de Almacenamiento (Días)	Control	Tratamiento con BHT	Tratamiento con mullak'a
C*	0	14.1	16.0	12.7
	3	11.6	14.4	11.3
	6	14.2	14.8	11.5
	9	13.1	15.0	10.8
	12	12.0	12.0	9.7
H*	0	0.9	1.2	1.2
	3	0.3	1.1	0.9
	6	1.4	2.2	1.5
	9	0.7	2.3	1.5
	12	1.1	1.5	2.0

En la tabla N° 33 se observan valores diferencia de color Euclídea (ΔE) superiores a 2 en los días 3, 6 y 12 para las muestras control; en los días 6, 9 y 12 para las muestras con BHT; y en los días 9 y 12 para las muestras con mullak'a. Fernandes R et al. sostienen que valores de ΔE superior a 2, indica cambios visuales en color que podrían ser percibidos por los consumidores.¹¹

TABLA N° 33: Diferencia de color Euclídea (ΔE) entre el día 1 y día 12 de almacenamiento refrigerado de la carne de alpaca control, con BHT y con el extracto del fruto de mullak'a.

Días de almacenamiento refrigerado	ΔE Control	ΔE Tratamiento con BHT	ΔE Tratamiento con mullak'a
3	3.9	1.7	1.9
6	2.6	3.8	1.6
9	1.5	3.5	2.5
12	2.4	4.7	3.8

V. DISCUSIONES

Se realizó la determinación del diámetro y peso promedio de los frutos de mullak'a obteniendo los resultados de la tabla N° 9, en las cuales se muestra que el diámetro promedio por unidad es de 3.12 mm siendo este valor la mitad del reportado por Teves F y Torres R² el cual establece un valor de 6 mm de longitud para el fruto. En el caso del peso promedio por unidad se obtuvo un valor de 50.18 mg que difiere del mismo autor, el cual reporta un valor de 96 mg por unidad de fruto. Estas diferencias encontradas se pueden deber a las diferentes procedencias del fruto que están ligadas al tipo de suelo, condiciones climáticas y altitud; ya que el fruto utilizado en nuestra investigación fue recolectado en el departamento de Ancash y el utilizado por el autor fue recolectado en el departamento de Cuzco.

Para el análisis proximal del fruto de mullak'a (tabla N° 10) se realizó la determinación del porcentaje de cenizas, grasa, humedad, proteínas y carbohidratos los cuales fueron de 0.9%, 0.3%, 80.5%, 4.4%, y 13.9% respectivamente; los cuales a excepción del porcentaje de cenizas, se encuentran lejanos a los valores reportado por Teves F y Torres R² en el cual determinan valores para el porcentaje de cenizas, grasa, humedad, proteínas y carbohidratos de 1%, 0.015%, 24.80%, 38.50% y 33% respectivamente. Esta diferencia entre los valores puede ser nuevamente atribuible a la procedencia de los frutos de mullak'a y/o también al grado de maduración de los mismos.

También se realizó la determinación de los metales más importantes como los son el calcio, hierro y potasio; obteniendo las siguientes cantidades 43.1, 6.4, 280.3 expresadas en mg/100 g de fruto respectivamente; resaltando dentro de estos tres el contenido de potasio del fruto. Al comparar nuestros resultados con el contenido de estos minerales en otros frutos similares como por ejemplo el sauco el cual según lo reportado por Paucar M.¹²² tiene un contenido de calcio y hierro de 30.6 y 2 mg/100 g de fruto respectivamente; y según el portal "Ecovidiasolar"¹²³ el sauco presenta valores de 280 mg/100 g de fruto de potasio; dentro de estos valores mencionados resalta en contenido de calcio y hierro de la mullak'a, ya que son mayores a los presentados por el sauco, mientras que el contenido de potasio es muy semejante en estos dos frutos. Al comparar los valores presentados para la mullak'a con los reportados por Pino C.¹²⁴ para el arándano, el cual presenta un contenido de calcio, hierro y potasio de 6, 0.17, 89 expresados en mg/100 g de fruto respectivamente; se observa que nuevamente la mullak'a presenta un mayor contenido de estos minerales. Además, es importante señalar que estos tres minerales desempeñan un papel importante en las funciones básicas de nuestro organismo.

En cuanto al contenido de vitamina C se obtuvo un resultado de 36.8 mg/100 g de fruto, que al compararlo con lo reportado por Paucar M.¹²² para el sauco el cual presenta un valor para vitamina C de 17.8 mg/100 g de fruto y lo reportado por Pino C.¹²⁴ para el arándano el cual presenta un contenido de 13 mg/100 g de fruto de vitamina C; se observa que la mullak'a presenta valores superiores a estos dos frutos mencionados.

Para la caracterización fisicoquímica se realizó la determinación del pH, acidez total titulable expresada en porcentaje de ácido cítrico y los grados Brix; obteniendo un pH promedio de 4.33, 0.58% de acidez expresada en ácido cítrico y 23.89 grados Brix (tabla N° 11). Estos resultados se encuentran cercanos a lo reportado por Teves F y Torres R² en el cual obtienen valores para pH de 4.99 y de acidez de 0.49% expresado en ácido cítrico, estas mínimas diferencias entre los resultados pueden ser producto del grado de madurez de los frutos o a la composición química del suelo del cual fueron recolectados, ya que este puede afectar a la composición química de las plantas limitando su crecimiento. Si bien Teves F y Torres R² no reportan valores para grados Brix del fruto al comparar los resultados con otros frutos como por ejemplo el arándano el cual posee 10 grados Brix según lo reportado por Feippe A. et al¹²⁵ y de 6,5 a 7,2 grados Brix para el sauco según lo reportado por Caballero C. y Soria D¹²⁶; se observa que la mullak'a supera a los valores reportados para los dos frutos mencionados, debido a que el grado Brix depende de la zona geográfica de la cual procede el fruto, encontrando el en fruto de mullak'a un potencial tecnológico para la elaboración de productos alimenticios.

El contenido de polifenoles del fruto mullak'a es de 463 mg de ácido gálico por 100 gramos de fruto, el cual es superior al valor reportado por García M.¹²⁷ en diferentes frutos como el arándano, frambuesa, fresa, granada mollar, granada wonderful, grosella, grosella negra, mora y uva; en los cuales los valores de polifenoles van desde 106 mg/100 de granada mollar hasta 309 mg/100 gramos de mora. Por lo tanto, se observa una mayor presencia de compuestos fenólicos en la especie de estudio. Además, se realizó la cuantificación de polifenoles totales para el extracto de fruto mullak'a, cuyo resultado fue de 5722 mg/100 de extracto, valor que comparado con el fruto fresco es superior debido a que durante el proceso de elaboración del extracto existe pérdida de agua, por lo tanto incrementa el volumen de la materia sólida. Es importante mencionar que los compuestos fenólicos que se encuentran en las frutas y vegetales, tienen un rol fundamental en la salud; ya que disminuyen el riesgo de enfermedades crónicas, tales como las enfermedades cardiovascular y cáncer.¹²⁸

Se realizaron las curvas de calibración del trolox, BHT y del extracto de mullak'a con la finalidad de hallar el IC₅₀ de cada uno de estos y poder comparar su actividad antioxidante; de lo cual se obtuvieron los IC₅₀ por el método DPPH para el trolox, BHT y extracto de mullak'a de 3.6, 11.7 y 52.7 expresados en µg/ml respectivamente. También se obtuvieron los IC₅₀ por el método ABTS para el trolox, BHT y extracto de mullak'a de 2.1, 2.1 y 18.1 expresados en µg/ml respectivamente. Lo cual comparado con lo reportado por Li X. et al.¹²⁹ los cuales determinaron un IC₅₀ para el trolox mediante el método de DPPH de 6.1 µg/ml y con ABTS de 2.5 µg/ml, se muestra que los valores hallados por la metodología ABTS están muy cercanos y los obtenidos mediante la metodología DPPH difieren de los valores de esta investigación. En el caso del BHT, Zhang Y. et al.¹³⁰ reportó resultados de IC₅₀ mediante el método DPPH y ABTS de 18.71 y 7.72 expresados en µg/ml respectivamente, los cuales están lejos de los valores obtenidos en este trabajo. Cabe resaltar que se observa una diferencia de concentraciones usadas entre las dos metodologías ya que con el método ABTS se utilizan concentraciones más bajas para llegar al IC₅₀ en comparación con el método DPPH, esto puede ser debido a que el método ABTS muestra más sensibilidad.

Según lo reportado por Teves F y Torres R² el IC₅₀ del extracto de mullak'a por el método DPPH es de 2.2247 µg/ml y por el método ABTS es de 4.077 µg/ml, los cuales están alejados de los valores obtenidos en este trabajo, esto debido a la diferencia en la metodología de extracción de los compuestos fenólicos y de los solventes utilizados para la extracción, los cuales fueron acetona y cloroformo, a diferencia del presente trabajo en el cual utilizamos etanol al 80%. También la diferencia presentada puede ser debida a la diferente procedencia de las muestras analizadas. Los valores de IC₅₀ del extracto de mullak'a se muestran menores a los reportados por Aparcana I. y Villareal L.¹³¹ para el extracto de aguaymanto proveniente de Huánuco, mediante las metodologías DPPH y ABTS mostrando valores de 1860 µg/ml y 1290 µg/ml respectivamente. Así mismo el valor de IC₅₀ del extracto de mullak'a por el método DPPH se muestra menor al IC₅₀ del extracto de pulpa de camu camu hallado mediante la metodología DPPH, según lo reportado por Sotero V. et al.¹³² el cual detalla un IC₅₀ de 167.67 µg/ml. Por lo tanto, se necesita una concentración menor de extracto de mullak'a para inhibir el radical en un 50%.

Se realizó la determinación de la actividad antioxidante para los frutos de mullak'a obteniendo porcentajes de inhibición de 46.78 por el método DPPH y de 71.81 por el método ABTS. Este resultado fue mayor a lo reportado por Lillo, A et al.¹³³ para el arándano, el cual presenta porcentajes de inhibición de 26,4 por el método DPPH y de 4.6 por el método ABTS, demostrando de esta manera que los frutos de la mullak'a presentan una mayor actividad antioxidante comparado con otros frutos similares.

El tamizaje fitoquímico realizado al extracto de frutos de mullak'a (tabla N° 12), evidenció la presencia de flavonoides, azúcares reductores, y antocianinas; debido a la ausencia de referencia bibliográfica del fruto de estudio para estos ensayos, los datos se contrastaron con resultados de extractos etanólicos de frutos similares con alta capacidad antioxidante, cuya propiedad es atribuida en su mayoría por estos metabolitos¹³⁴, ya que ejercen efectos protectores en procesos fisiológicos en los que se ve involucrado el estrés oxidativo¹³⁴. Es así que en tales extractos de arándano (*vaccinium corymbosum* L.) y arándano (*vaccinium myrtillus*), también se identificaron presencia de los flavonoides, y antocianinas, así como también azúcares reductores.^{135,136} Sin embargo otros estudios realizaron pruebas fitoquímicas al extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcanica* (mullak'a), obteniendo reacciones positivas para taninos, y flavonoides, así mismo reacciones negativas para alcaloides y saponinas, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el extracto etanólico del fruto mullak'a.¹³⁷

En cuanto a la capacidad de retención de agua para la carne fresca de alpaca *Longissimus thoracis* (LT) (sin antioxidante), se expresó como porcentaje de pérdida de agua por cocción (22.69 %), y pérdida de agua por presión (27.09 %), este resultado fue similar a otro autor quien reporta en ese orden para el músculo *L. Lumborum* fresco de alpaca, valores de 23.73 %, 26.41 % respectivamente³¹, así también, se encontraron valores de CRA parecidos para músculo *Longissimus thoracis* y *Lumborum* (LTL) de carne fresca de alpaca, (21,06 por ciento y 31,35 por ciento, respectivamente)³⁰, cabe resaltar que estos autores evaluaron un musculo diferente al evaluado en el presente estudio, cuyas variaciones en los resultados de estas pérdidas pueden deberse a este factor.¹³⁸

En el musculo de estudio, se observó encogimiento de largo y ancho después de la cocción, con valores de 21.6 por ciento \pm 5.32 y 21.5 por ciento \pm 7.48, esto debido al calentamiento de la carne que al llegar a una temperatura próxima a los 75 °C, sus proteínas se desnaturalizan, produciendo cambios estructurales como el, encogimiento longitudinal y transversal de las fibras, con una retracción importante debida a la pérdida de agua, es así que estos fenómenos, están relacionados con la Capacidad de Retención de Agua en la carne cuando se somete a calor. ¹³⁹

El resultado de humedad hallado en muestras sin antioxidante (*Longissimus thoracis*), fue de 72.14% similar a los reportados para el músculo *Semimembranosus* (SM) de alpaca con 73.5% de humedad¹⁴⁰; así mismo se encontró en músculos *Longissimus thoracis* una humedad de 74,07%³¹, todos pertenecieron a una edad entre 18 a 24 meses, ya que se recomienda que sea alrededor de los dos años de edad, debido a que la probabilidad de presencia de parásitos es menor, lo cual genera menos pérdida económica y calidad sensorial.¹⁴¹ mientras que otro autor, determinó un 75.62 % de humedad en alpacas de 2 y 2.5 años de edad en *Longissimus thoracis*³⁰, estos valores resultaron similares. Sin embargo, la humedad fue ligeramente mayor, para este último, ya que uno de los factores de variabilidad en la composición química proximal de la carne son principalmente la edad, sexo de los animales, alimentación y músculo de procedencia de la muestra,^{142, 143} adicional a ello este valor de 72.14%, se halla dentro del rango mencionado por la NTP 201.043 (71.9 -77.3%).³⁴

Para detectar si hay cambios perceptibles entre las muestras tratadas, la estrategia consistió en utilizar como instrumento un panel sensorial entrenado, quienes evaluaron atributos en cuanto a su aspecto general, color, olor y consistencia ya que estos como indicadores de calidad influyen sobre la decisión final del consumidor en el momento de elegir un producto.¹⁴⁴

De este modo en aspecto general, existe diferencia significativa entre los tratamientos; cuyas muestras tratadas con extracto etanólico de mullak'a, se les asignó en cada tiempo las menores puntuaciones (tabla N° 28), lo que se interpreta según la referencia de escala usada (puntuación cero: mala y puntuación diez: muy buena); lo cual podría explicarse al color atribuido por el fruto de mullak'a, quien al ser oscuro no genera un buen aspecto. A su vez las puntuaciones para estas mismas muestras, descienden a medida que el tiempo de almacenamiento es mayor, lo que equivale a decir que su aspecto cada vez es poco aceptable, sin embargo una excepción durante la descendencia de estas puntuaciones, se experimenta desde el tiempo uno (puntaje: 3.31), hacia el tiempo dos (puntaje: 5.19), lo cual no parece coherente, pero que puede ser explicado al relacionar el cambio significativo de color adquirido por la misma muestra (tabla N° 28, figura N° 20), quien impacto sensorialmente al juez, otorgándole así un bajo puntaje; y puesto que para las puntuaciones de atributo color esta oscilación de puntaje incide en los mismos tiempos, esto explica la relación entre ambos atributos quien afirma que al aumentar las puntuaciones de color (cero: color carne fresca; a diez: color carne deteriorada), disminuye las puntuaciones de aspecto general (cero: mala; diez: muy buena), expresado en términos de aceptación.

Así mismo en este atributo de color, los jueces hallaron diferencias significativas (tratamiento BHT y Tratamiento mullak'a), a partir del sexto día de almacenamiento, quienes a mayor tiempo fueron asignadas mayores puntuaciones; bajo una escala referencial de puntuación (cero: coloración de carne fresca de alpaca; y diez: color de una carne deteriorada); cabe resaltar que un factor de alteración del color característico de la carne, es dado por la oximioglobina, ya que cuando este pigmento se oxida, se torna púrpura (deoximioglobina) o amarronado (metamioglobina)¹⁴⁵. Por otro lado la coloración negruzca azulada característico del extracto de mullak'a también es un factor responsable que influyo sobre las puntuaciones de las muestras tratadas, quienes también marcaron diferencias significativas, es así que se relaciona una mayor puntuación a las muestras más oscuras.

Al evaluar la consistencia, los jueces hallan diferencia significativa a partir del sexto día de almacenamiento (tabla N° 28), estos cambios surgen cuando la carne al sufrir descomposición pierde la conformación de estructuras proteicas y enlaces débiles, desencadenando exudado de agua, y pérdida de firmeza, a su vez los compuestos de elevado peso molecular, tales como las lipoproteínas, se ven particularmente afectados por la desnaturalización, lo que ocasiona lesiones en las membranas celulares¹⁴⁶ lo cual se reflejó al asignar cada vez mayores puntuaciones a las muestras con mayor tiempo de almacenamiento, cuya referencia es una escala; desde puntuación cero (consistencia de carne fresca), hasta puntuación diez (consistencia de carne a 15 días de almacenamiento).

En cuanto al olor, los jueces detectaron diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento de cada muestra, con valores iniciales de 2.73 hasta un máximo de 6.92; bajo el mismo criterio de cero (olor a carne fresca) hasta diez (olor a carne con 15 días de almacenamiento); se dice que cambios en el olor y color son desencadenados por alteraciones microbianas.¹⁴⁷

Se considera que el color de la carne fresca es el atributo sensorial más importante de calidad del producto, ya que los consumidores utilizan el nivel de decoloración como un indicador de frescura y salubridad.¹⁴⁷ La carne fresca sin tratamiento *Longissimus thoracis*, tuvo en promedio 42,7; 10.89; y 8.9; para L*, a* y b*, respectivamente, no obstante en el mismo orden, se reportaron valores de 36.17; 15,05 y 1.16 para el musculo *semimembranosus* (SM)¹³⁹, Asi mismo otro estudio para el músculo *Longissimus lumborum* de alpaca, expreso valores de 32,3; 11,8 y - 6,69, para L*, a* y b*, respectivamente³¹, con el presente análisis se puede señalar que el tipo de corte influye en dichos parámetros, así también otros factores que podrían afectar el color son la velocidad de glucólisis post mortem, niveles de pigmentos y estado oxidativo propio del musculo.¹⁴⁸ Bajo este mismo método instrumental en la tabla N° 31, el nivel de luminosidad L*, y componentes a* y b*, de las muestras tratadas con extracto de mullak'a resultó significativamente menor que las muestras con BHT y muestras sin antioxidante, esto debido al color negruzco azulado del extracto usado, quien otorgo cierto grado de oscurecimiento sobre dichas muestras.

A su vez valores de C^* (saturación), resultaron menores, para aquellas muestras tratados con mullak'a, pues un valor bajo en el croma indica un color apagado, cercano al gris¹⁴⁷, lo que también puede ser atribuido por la coloración del extracto; en tanto que el tono (H^*) de estas mismas muestras tratadas con mullak'a, se hallaron en valores intermedios de las demás (tabla N° 32).

La Diferencia entre dos estímulos de color, es definida como la distancia euclídea entre dos puntos¹⁴⁸, una puntuación mayor a dos, indica que es percibida sensorialmente²⁴, los tratamientos con BHT se perciben a partir de sexto día de almacenamiento al indicar una puntuación de 3.82, en tanto que tratamientos con mullak'a, se perciben a partir del día nueve cuya puntuación indica 2.52, resultando así ventajoso respecto al BHT, ya que indica una menor variación de color en el tiempo transcurrido de almacenamiento.

El crecimiento microbiano, es la principal causa del deterioro de la carne almacenada a temperaturas de refrigeración.¹⁵⁰ La tabla N° 29 evidencia el conteo de Bacterias aerobias mesófilas expresado en Log 10 UFC/g, con valores de 3.87 (muestra sin antioxidante), 4.34 (Muestra con BHT), y 3.88 (Muestra con mullak'a), correspondientes al día cero, quienes se hallan dentro de límites permitidos por la Norma Técnica Peruana 201.043, así como también para la Norma Sanitaria de DIGESA, quienes especifican un máximo de 6.0 en Log 10 UFC/g y un máximo de 7.0 en Log 10 UFC/g respectivamente. A su vez se observan incrementos significativos en el crecimiento microbiano a partir del tercer día quienes superan dichos límites, lo cual nos indica que tanto el BHT como el extracto de mullak'a no ejercieron efectos antimicrobianos sobre la carne de alpaca.

El pH de la carne fresca de alpaca fue 5.97 en promedio, Estudios similares reportan valores menores (pH= 5,61), (pH= 5,75), en ambos casos se analizaron el músculo LTL en carne fresca de alpaca³⁰, sin embargo, al contrastar otro estudio con valores para el musculo semimenbranosos (SM)¹³⁹, se expone un PH de 6.34 de alpaca. Esta diferencia de resultados señala que el pH puede variar según la región anatómica, siendo la referencial un pH 5.8 para Brazuelo y pH de 6,18 para pierna.^{28, 26} Además, INDECOPI (2005)³⁴ afirma que el rango establecido de pH para carne fresca de alpaca es 5,5 - 6,4. Por ende, la carne empleada en la investigación también cumple con el valor de pH adecuado.

La tabla N° 30 señala para cada tratamiento el incremento en los valores de PH, estas variaciones de pH se asocian a degradación de aminas¹⁵¹, los valores reportados hasta el día 9, se ubican dentro del rango permitido por la NTP, sin embargo a partir del tercer día, se detectan cambios sensoriales, y valores no permitidos microbiológicamente, Similar a lo reportado por otros autores en matrices cárnicas. Han señalado, una dependencia importante del crecimiento microbiano respecto a variables fisicoquímicas y sensoriales, y a como consecuencia de ello, se presentaron cambios indeseables en el pH, color y la apariencia.¹⁵²

VI. CONCLUSIONES

La muestra de carne molida de alpaca que contiene el extracto del fruto de mullak'a a la concentración de 862 mg de extracto del fruto de mullak'a por kg carne, otorgó estabilidad en el parámetro de pH, color CIELab y en los atributos sensoriales de consistencia y olor, en las condiciones probadas; por lo que se recomienda su uso como antioxidante natural en la carne molida de alpaca.

En el análisis fitoquímico preliminar del extracto del fruto de mullak'a se obtuvieron resultados negativos para alcaloides, taninos y saponinas; y resultados positivos para flavonoides, azúcares reductores y antocianinas. Lo cual asegura su uso en la industria alimentaria sin causar daño a la salud de los consumidores.

En la determinación de la actividad antioxidante del extracto del fruto de mullak'a se obtuvo un IC_{50} por el método DPPH de 52.7253 $\mu\text{g/ml}$ y un IC_{50} por el método ABTS de 18.099 $\mu\text{g/ml}$.

Las muestras de carne con extracto del fruto de mullak'a mostraron estabilidad sobre el parámetro de pH hasta el día doce de almacenamiento con un pH de 6.47; así mismo el parámetro de color CIELab, expresado como diferencia Euclídea, se mantuvo sin cambios visuales hasta el día seis de almacenamiento con un valor de 1.6. A nivel microbiológico no se evidenció efecto protector, siendo el recuento aceptable solo hasta el día tres con un valor de 8.04 en Log 10; y con respecto a los parámetros sensoriales no tuvo efecto protector en los atributos aspecto general y color, mientras que si tuvo un efecto protector de los atributos consistencia hasta el día nueve de almacenamiento y del atributo olor hasta el día tres de almacenamiento a diferencia de los otros tratamientos.

Las muestras de carne de alpaca tratadas con extracto del fruto de mullak'a fueron más oscuras que las muestras tratadas con BHT; microbiológicamente los tratamientos con extracto del fruto de mullak'a y con BHT no mostraron tener efectos antimicrobianos, reportando valores aceptables de 8.04 y 8.1 en Log 10 respectivamente, hasta el tercer día de almacenamiento. El pH de las muestras con BHT fueron aceptables hasta el noveno día almacenamiento con un valor de 6.05, y de las muestras con extracto del fruto de mullak'a aceptables hasta el doceavo día con un valor de 6.47.

VII. RECOMENDACIONES

Ejecutar análisis complementarios utilizando diferentes concentraciones del extracto del fruto de mullak'a sobre las muestras tratadas, de tal manera que en cada una de ellas se evalúe su estabilidad mediante los parámetros mencionados.

Potenciar el efecto del extracto del fruto de mullak'a con antimicrobianos naturales para una mayor conservación microbiológica de la carne de alpaca.

Realizar estudios adicionales orientados a la aplicación del extracto del fruto de mullak'a en otras matrices alimentarias, utilizando otros tipos de almacenamiento.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Agapito F, Sung I. Fitomedicina: 1100 Plantas Medicinales. Perú: Editorial Isabel; 2005.
2. Teves F, Torres R. Estudio comparativo de la actividad antioxidante in vitro de los extractos antociánicos y caracterización de las antocianidinas en los frutos de las especies vegetales *Prunus serotina* (Capuli), *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) (Mullak'a), *Monnina salicifolia* R. & P: (Aceitunilla) [Tesis de pregrado]. 2011. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú.
3. Quina E. Diagnóstico de la crianza y caracterización fenotípica de las llamas k'ara (*Lama glama*) en Marcapomacocha, Región Junín [Tesis de Maestría]. 2015. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
4. Jiang J, Xiong Y. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Sci.* 2016; 120: 107-117.
5. Kumar Y, Yadav D, Ahmad T, Narsaiah K. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2015; 14: 796-812.
6. Martínez N, Camacho M, Martínez J. Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Rev Esp Nutr Hum Diet.* 2008; 12(2): 64-68.
7. Medina R, Dupertuis L, Amadio C, Dip G, Zimmermann M, Espejo C, et al. Aceite esencial de tomillo como antioxidante y conservador de hamburguesas funcionales. *Rev. Fac. Cienc. Agrar.* 2003; 35(2): 13-23.
8. Rodríguez J, Morcuende D, Andrade M, Kylli P, Estévez M. Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation in Porcine Patties. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59 (10): 5625-5635.
9. Karre L, Lopez K., Getty J. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Sci.* 2013; 94: 220-227.
10. El-Nashi H, Abdel A, Abdel N, El-Razik M. Quality characteristics of beef sausage containing pomegranate peels during refrigerated storage. *J Agric Sci.* 2015; 60 (2): 403-412.
11. Fernandes R, Trindade M, Lorenzo J, Muneke P, De Melo M. Effects of oregano extract on oxidative, microbiological and sensory stability of sheep burgers packed in modified atmosphere. *Food Control.* 2015; 63: 65-75.
12. Serhat T., Ayla S., Fatma I. Effect of pomegranate peel extract on lipid and protein oxidation in beef meatballs during refrigerated storage. *Meat Sci.* 2016; 116: 126-132.

13. Selani M, Contreras C, Shirahigue L, Gallo C, Plata M, et al. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat Sci.* 2011; 88(33):397-403.
14. Sinche Justo. Estudio Farmacognóstico y Farmacológico de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth) "mullak'a" [Tesis de pregrado]. 1956. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
15. Brako L, Zarucchi J. Catalogue of the flowering plants and Gymnosperms of Peru. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Garden.* 1993; 45: 1- 1286.
16. Mannfried Pahlow. *El Gran Libro de las Plantas Medicinales*. España: Editorial Everest S.A, 1980.
17. Mantilla Holguin J. *Las Plantas Medicinales de Nuestra Madre Tierra*. 2 ed. Cusco: Editorial Alpha, 2004.
18. Moscoso Catilla M. *Secretos Medicinales de la Flora Peruana y Guía de la Maternidad*. 4 ed. Cusco: Editorial Alpha, 1997.
19. Wheeler, J.C. Origen, evolución y status actual. En: *Avance y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. Santiago, Chile: Editorial Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, 1991: 11-48.
20. Stanley HF, Kadwell M, Wheeler JC. Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study. *Proc R Soc Lond. B.* 1994; 256:1-6.
21. Wheeler JC. Historia Natural de la Vicuña. En: *Investigación, conservación y manejo de las vicuñas – Proyecto MACS*. Buenos Aires : Editorial Universitaria, 2006: 208.
22. INEI: Instituto Nacional de estadística e Informática [internet]. Lima: INEI;c2012[citado 22 abril 2018] . *IV Censo Nacional Agropecuario 2012*. Disponible en: <https://proyectos.inei.gob.pe/CenagroWeb/index.htm#>
23. SENASA (SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA). 1995. Decreto Supremo. DECRETO SUPREMO Nº 22-95-AG: Reglamento tecnológico de carnes.
24. Fernández, S. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú (Proyecto de cooperación técnica de la FAO para el apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la Región Andina). Proyecto de Cooperación Técnica TCP/RLA/2914. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Noviembre, 2005.
25. INIA-MINAGRI (Instituto Nacional de Investigación Agraria-Ministerio de Agricultura y Riego) Programa Nacional de Camélidos. Lima, Perú. 2018.

26. Zorogastúa Frisancho J. Aplicación del diseño de mezclas en la elaboración de chorizo ahumado utilizando carne de alpaca y carne de cordero [Tesis pregrado]. 2004. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
27. Palacios, R. Elaboración de embutidos tipo Hot dog y Mortadela a partir de la carne de alpaca (Lama pacos) [Tesis pregrado]. 1987. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
28. Cabrera, L. Utilización de carne de cordero (Ovis aries) y alpaca (Lama pacos) en productos tipo salchicha frankfurt y jamón ahumado [Tesis pregrado]. 2003. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
29. Guerra, M. Desarrollo de productos con carne de alpaca: Proyecto de cooperación técnica de la FAO para el apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la Región Andina. Roma: Proyecto de Cooperación Técnica. 2005. TCP/RLA/2914.
30. Medina Valdivieso K. Evaluación De Las Propiedades Tecnológicas De La Carne De Alpaca (Vicugna pacos) Envasada Al Vacío Durante El Almacenamiento En Congelación [Tesis pregrado]. 2014. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
31. Salvá Ruiz B. Caracterización de la carne y charqui de alpaca (Vicugna pacos) [Tesis Doctoral]. 2009. Universidad de León, España.
32. Cristofanelli S, Antonini M, Torres D, Polidori P, Renieri C. Meat and Carcass quality from Peruvian llama (Lama glama) and alpaca (Lama pacos). Meat Sci 2004; 66(3): 589-593.
33. Badiani A, Nanni N, Gatta P, Bitossi F, Tolomelli B, Manfredini M. Nutrient content and retention in selected roasted cuts from 3 month-old ram lambs. Food Chem 1998; 61(1): 89-100.
34. Instituto Nacional De Defensa De La Competencia y De La Protección De La Propiedad Intelectual. Carne y productos cárnicos. Definiciones, requisitos y clasificación de las carcasas y carne de alpacas y llamas. Lima, Perú: INDECOPI, 2005. N°. 201.043.
35. Ministerio de Salud. Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano, carnes crudas, picadas y molidas. 2008. N° 591.
36. Romero M. Evaluación de plantas medicinales con propiedades antioxidantes en los distritos de Ayacucho, Carmen Alto y Quinoa de la provincia de Huamanga-Ayacucho. [Tesis de pregrado]. 2006. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga, Ayacucho.

37. Del Rosario Giovanna. Evaluación de la Actividad Antioxidante de la Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) en un Modelo Experimental de Diabetes en Ratas Wistar [tesis de maestría]. 2007. Instituto Politécnico Nacional. Santiago de Querétaro, México.
38. Lynch MP, Faustman C. Effect of Aldehyde Lipid Oxidation Products on Myoglobin. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (3): 600-604.
39. Warriss P. Ciencia de la carne. Zaragoza, España: Editorial Acribia. 2003.
40. Mottram D. Lipid oxidation and flavour in meat and meat products. *Food Sci. Technol* 1987; 1: 159-162.
41. López C, Isabel B, Rey A. Efecto de la nutrición y del manejo sobre la calidad de la grasa en el cerdo. En: XV Curso de Especialización. Avances en Nutrición y Alimentación Animal. España: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, 1999: 223-252.
42. García P. Estudio fisicoquímico y microbiológico de la estabilidad de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) ahumada y envasada al vacío [Tesis pregrado]. 1996. Universidad Nacional Agraria, Perú.
43. Halliwell & Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J clin Nutr* 1993; 57: 715-725.
44. Fernández J, Pérez J, Fernández-López J. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem* 1997; 59(3): 345-353.
45. Mohamed A, Jamilah B, Abbas K, Abdul R. A review on lipid oxidation of meat in active and modified atmosphere packaging and usage of some stabilizers. *J Food Agric Environ* 2008; 6(3): 76-81.
46. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300(2): 535-543.
47. Hamilton R. The chemistry of rancidity in foods. In: Rancidity in foods. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999: 1-21.
48. Maestre R. Mecanismos implicados en la acción antioxidante de polifenoles naturales en productos de la pesca y acuicultura [Tesis Doctoral]. 2012. Universidad de Santiago de Compostela, España.
49. Morrissey P, Sheehy P, Galvin K, Kerry J, Buckley D. Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci* 1998; 49(1): 73-86.
50. Ávila F. Uso de antioxidantes naturales para mantener la estabilidad oxidativa de la carne de pollo [Tesis Doctoral]. 2011. Colegio de Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad Ganadera, Montecillo.

51. Navarro G, Bringas L, Pacheco R. Nuevas herramientas para el estudio de la oxidación de los ácidos grasos, una de las causas fundamentales en la pérdida de calidad de los alimentos para la acuicultura. En: Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, México: M editorial, 2004: 16-19.
52. Amzad M. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. Arab J Chem. 2015; 8(1):66–71.
53. Velioglu Y, Mazza G, Gao L, Oomah B. Antioxidant and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. J Agric Food Chem. 1998; 46(10):4113-4117.
54. Pietta P, Simonetti P, Mauri P. Antioxidant Activity of selected medicinal Plants. J Agric Food Chem. 1998; 46(10):4487–4490.
55. Emanuel V, Adrian V, Sultana N. The obtaining of an antioxidant product based on a *Rosmarinus officinalis* freeze-dried extract. Int. J. Pharmacol. 2010; 6: 425–430.
56. Chen D. and Q.P. Dou, Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. Int J Mol Sci 2008; 9(7):1196-206.
57. Perez F, Duarte J, Jimenez R, Santos C, Osuna A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. Pharmacol Rep. 2009; 61:67-75.
58. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev. 1998; 56:317-333.
59. Kähkönen M, Heinonen M. Berry fenolics and their Antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 2001; 49:4076-4082.
60. Roginsky V, Lissi E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chem. 2005; 92:235-254.
61. Torres Y. Actividad Biológica Y Aplicaciones Terapéuticas En Cáncer Del Compuesto Natural Pentagaloilglucosa [Tesis Pregrado]. 2011. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, Colombia.
62. De Kok T, van Breda S, Manson M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. Eur.J.Nutr 2008; 47:51-59.
63. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am.J.Clin.Nutr 2004; 79:727-747.
64. Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. Mol.Nutr. Food Res 2008; 52:507-526.

65. Binsack R, Boersma BJ, Patel RP, Kirk M, White CR, Darley-USmar V, et.al. Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. *Alcohol.Clin. Exp.Res.* 2001; 25:434-443.
66. Coulibaly A, Kiendrebeogo M, Kehoe P, Sombie P, Lamien C, Millogo J, et.al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. *J.Med.Food.* 2011; 14:1576-582.
67. Quiñones M, Miguel M Aleixandre A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol.Res.* 2013; 68:125-131.
68. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev.* 2014; 8:122-146.
69. Halliwell. Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and in vivo. In: *Handbook of Antioxidants*. New York, EE. UU: editors Marcel Dekker, Cardenas E, Packer L, 2001: 1- 46.
70. Shahidi F. Antioxidants: principles and applications. In: *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Woodheap Publishing 2015; 1-14.
71. Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JLFC, Reis S, Borges F. Antioxidant profile of dihydroxy-and trihydroxyphenolic acids- A structure-activity relationship study *Free Radic Res.* 2006; 40:433-42.
72. FAO/OMS [Internet]. Ginebra: Codex Alimentarius: c1962-2018. Disposiciones de la GSFA para hidroxitolueno butilado (BHT); 2018 [cited 2018 May 6]; [about 2 screens]. Available from: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>.
73. Shahidi F, Wanasundara U. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: *Food lipids, chemistry, nutrition and biotechnology*. New York, EEUU: editorial C. C. Akoh, & D. B. Min, 2002.
74. Ferretti G, Bacchetti T, Belleggia A, Neri D. Cherry antioxidants: from farm to table. *Molecules.* 2010; 15(10): 6993-7005.
75. Panicker P, Sisilamma G, Dhanush B. Toxicity study of butylated hydroxyl toluene (BHT) in rats. *World J Pharm Pharm Sci.* 2014; 3(8):758-763.
76. Shahidi F, Janitha P, Wanasundara P. Phenolic Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1992; 32(1):67-103.
77. Hudson B.J. Food antioxidants. London, Editor: Elsevier applied science, 1999.
78. Shahidi F, Naczki M. Antioxidant Properties of Food Phenolics. In: *Phenolics in food and nutraceuticals*. New York: editorial CRC press, 2003:397-438.
79. Wanasundara P, J. P. D, Shahidi F. Antioxidants: Science, technology and applications. In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects*, New Jersey: editorial Wiley-Blackwell, 2005:431-489.

80. Hirose M, Hagiwara A, Hasui T, Inoue K, Ito N. Combined effects of BHA and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats. *Cancer Lett.* 1986; 30(2):169-174.
81. Branen A.L. Toxicology and Biochemistry of BHA and BHT. *J.Am. Oil Chem soc.* 1975; 82:59-63.
82. Earle F, McGuire T, Hallan J, Bagbt M, Wolf A. Search for new industrial oils. Oils with high iodine value. *J. Am. Oil Chemi Soc.* 1977; 37:48-50.
83. Lund M, Hviid M, Skibsted L. The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Sci.* 2007; 76:226–233.
84. Marx J. Oxygen free radicals linked to many diseases. *Sci.* 1987; 235:529-531.
85. Bou R, Codony R, Tres A, Decker E. Dietary strategies to improve nutritional value, oxidative stability and sensory properties of poultry products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2009; 8:800-822.
86. Verbeke W, Van O, Warnants N, Viaene J, Boucque C. Consumer perception, facts and possibilities to improve acceptability of health and sensory characteristics of pork. *Meat Sci.* 1999; 53:77-99.
87. Huang D, Ou B, Prior R. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:1841-1856.
88. Cicco N, Lanorte M, Paraggio M, Viggiano M, Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem J.* 2009; 91:107-110.
89. Blois M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958; 181:1199-1200.
90. Alam M, Bristi N, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J.* 2012; 21:143-152.
91. Deng J, Cheng W, Yang G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH* assay. *Food Chem.* 2011; 125:1430-1435.
92. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26:1231-1237.
93. Zuleta A, Esteve M, Frigola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem* 2009; 114:310-316.
94. Tovar J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera [Tesis de pregrado]. 2013. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

95. Piggott J. Design questions in sensory and consumer science. *Food Qual Preference*. 1995; 6(4): 217-220.
96. Spanier A, Vercellotti J, James J. Correlation of sensory, Instrumental and chemical attributes of beef as influenced by meat structure and oxygen exclusion. *J. Food Sci.* 1992; 57(1):10-15.
97. Latimer G. *Official Methods of Analysis of AOAC International Methods*. Gaithersburg, Estados Unidos: AOAC International, 2016.
98. Latimer G. *Official Methods of Analysis of AOAC International Methods..* Gaithersburg Estados Unidos: AOAC International, 2012.
99. Collazos C. La composición de alimentos de mayor consumo en el Perú. Lima: Instituto Nacional de Nutrición. 1993.
100. Egan H, Kirt R, Sawyer R. *Análisis Químico de los Alimentos de Pearson*. México D.F: Editorial Continental S.A, 1991.
101. Ministerio de Salud. Productos elaborados a partir de frutas y otros vegetales, Determinación de la acidez. Lima, Perú.2012. Norma Técnica Peruana 203.070
102. Arévalo G, Boncún B, Ruiz G, Soto M, Venegas E. Estudio Fitoquímico y Efectos Sedativo e Hipnótico de *Solanum melongena* var. *esculentum* (Dunal) Nees en *Cavia porcellus* en Comparación con Diazepam. *Pharmaciencia*. 2014; 2(2): 56-63.
103. Romero R. Cuantificación de Polifenoles en hojas de Uña de gato *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult) DC. proveniente de tres localidades en Ucayali [Tesis Pregrado]. 2012. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
104. Robles M, Aguilar A, Gutiérrez M, Rodríguez F, Morales J, Guerrero P, et. al. Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER). *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. 2016; 18(3):3-8.
105. Herrera X, Rodríguez K. Evaluación del extracto de flavonoles y antocianinas contenidos en el agraz (*Vaccinium meridionale swartz*) obtenidos a nivel laboratorio por medio de los métodos de extracción por solventes y extracción asistida por microondas [Tesis Pregrado]. 2016. Fundación Universidad de América. Bogotá D.C.
106. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 1965; 16:144-58.
107. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebenson Wiss Technol.* 1995; 28(1): 25-30.
108. Nollet L, Toldrá F. *Handbook of Muscle Foods Analysis*. Editorial Taylor & Francis Group. 2009.

109. Defreitas Z., Sebranek J, Olson D, Carr M. Freeze thaw stability of cooked pork sausage as affected by salt, phosphate, pH and Cartageenan. *J. Food Sci.* 1997; 62: 551–554.
110. Lee M., Han J, Jeong J, Choi J, Choi S, Kim H. Effect of kimchi powder level and drying methods on quality characteristics of breakfast sausage. *Meat Sci.* 2008; 80:708-714.
111. George M, Berry B. Thawing prior to cooking affects sensory, shear force and cooking properties of beef pattie. *J. Food Sci.* 2000; 65 (1):2-8.
112. Fernandes R, Trindade M, Tonin F, Pugine S, Lima C, Lorenzo J, De Melo M. Evaluation of oxidative stability of lamb burger with *Origanum vulgare* extract. *Food Chemistry.* 2017; 233(2017): 101-109.
113. Kuskoski E, Asuero A, Troncoso A , Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2005, 25(4): 726-732.
114. Saldaña E, Saldarriaga L, Cabrera J, Siche R, Aurélio de Almeida M, Behrens J, Mabel M, Contreras C. Descriptive analysis of bacon smoked with Brazilian woods from reforestation: methodological aspects, statistical analysis, and study of sensory characteristics. *Meat Sci.* 2018;140: 44-50.
115. ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies. *Methods de enumeration de microorganisms in: Microorganismos de los alimentos 1.* Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A, 2000.
116. American Meat Science Association. Guidelines for meat colour evaluation. In: Originally published in the Proceedings of the 44th Reciprocal Meat Conference, Savoy, USA: American Meat Science Association. 1991.
117. Honikel K. Reference methods supported by OECD and their use in Mediterranean meat products. *Food Chem.* 1997(9); 573-582.
118. Zook K, Wessman C. The selection and use of judges for descriptive panles. *Food Technol.* 1977; 56-61.
119. Costell E, Durán L. El análisis sensorial en el control de calidad de los alimentos III. Planificación, selección de jueces y diseño estadístico. *Agroquímica y Tecnología Alimentaria.* 1981; 21(4): 454-470.
120. Anzaldúa A. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Zaragoza, España: Editorial Acribia. 1994.
121. Institute of Food Technologists: IFT . Sensory Evaluation Guide for testing Food and Beverage Products. *Food Technol.* 1981; 35(11): 50-59.

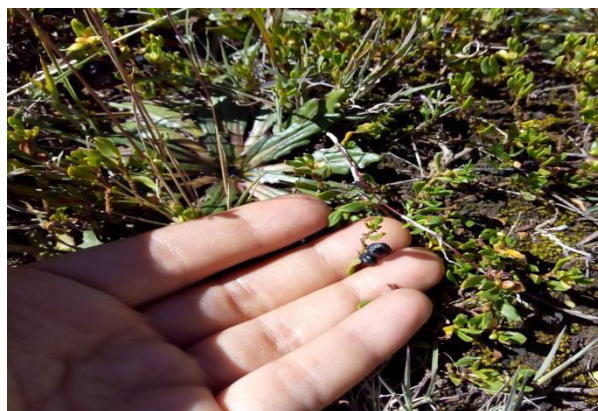
122. Paucar M. Influencia de la adición del sauco (*sambucus peruviana* L.) en las características fisicoquímicas y organolépticas del yogurt natural [Tesis Pregrado]. 2014. Universidad nacional de Huancavelica, Perú.
123. Ecovidasolar [Internet]. Sevilla, España: Tabla Nutricional del Sauco (*Sambucus Nigra*); 2018. [cited 2018 Jul 15]; [about 1 screen]. Available from: <https://www.ecovidasolar.es/blog/sauco-sambucus-nigra/>.
124. Pino C. Descripción del desarrollo vegetativo y de las características físicas y químicas de los frutos de cuatro clones de arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.) [Tesis Pregrado]. 2007. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
125. Feippe A, Ibáñez F, Fredes A, Varela P, Lado J. Efecto del estado de desarrollo de arándanos sobre las propiedades físico – químicas. INIA. 2012; 30: 39-42.
126. Caballero C, Soria D. Elaboración de licor de sauco (*sambucus nigra* L.) en barricas de madera de castaño en el laboratorio de agroindustrias Utea – Abancay [Tesis Pregrado]. 2017. Universidad tecnológica de los andes. Abancay, Perú.
127. García M. Contenido en antocianos y compuestos fenólicos de diferentes frutos frescos y deshidratados [Tesis Maestría]. 2016. Universidad Miguel Hernández de Elche. Orihuela.
128. Boyer J, Lui RH. Apple phytochemicals and their health benefits. Nutrition Journal. 2004; 3:1-15.
129. Li X, Wu X, Huang L. Correlation between Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Radix Angelicae Sinensis (Danggui). Molecules. 2009; 14: 5349-5361.
130. Zhang Y, Yin Z, Gu X, Kang W. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity of *Adina rubella* Hance in vitro. Afr J Pharm Pharmacol. 2012; 6(41):2888-2894.
131. Aparcana I. y Villareal L. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos del fruto de *Physalis peruviana* “aguaymanto” de diferentes lugares geográficos del Perú [Tesis Maestría]. 2014. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
132. Sotero V, Silva L, García D, Imán S. Evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa, cáscara y semilla del fruto del camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.). Rev Soc Quím Perú. 2009; 75 (3):293-299.
133. Lillo A, Carvajal F, Nuñez D, Balboa N, Alvear M. Cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en

- distintos berries nativos del Cono Sur de América. Revista de Investigaciones Agropecuarias. 2016; 42(2): 168-174.
134. Kuskoski M, Asuero A, Troncoso J. Manani-Filho, R Fett, Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, Food Sci. Technol. 2005: 25(4):726-732.
 135. Reyes F, Vega K. Características Farmacognósticas y cuantificación del contenido de polifenoles totales del fruto de *Vaccinium corybosum* L. "arandano" [Tesis pregrado]. 2017. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
 136. Medina L. Evaluación en el rendimiento de las extracciones variando pH y Cuantificación de Antocianinas Totales por el método de pH diferencia en el Extracto Etanólico *Vaccinium myrtillus* Arándano [Tesis pregrado]. 2016. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
 137. Arauco K. Efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de *Muehlenbeckia volcánica* (Bentham) Endlicher (mullaca) sobre el granuloma inducido por carragenina en ratas [Tesis Maestría]. 2016. Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Perú.
 138. Rengifo L, Ordoñez E. Efecto de la temperatura en la capacidad de retención de agua y PH en carne de res, cerdo, pollo, ovino, conejo y pescado paco. ECIPerú. 2010; 7(2):77-85.
 139. Torres M. Determinación de la textura. En: Estandarización de las Metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa), INIA. 2005. 243-250.
 140. Lavado M. Efecto del Marinado, congelación y descongelación sobre las propiedades tecnológicas de la carne de alpaca (*Vicugna pacos*) [Tesis pregrado] 2018. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
 141. Hack W. The Peruvian alpaca meat and hide industries (Report). Barton, Australia, Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC). 2001; 1(19):11
 142. Polidori P, Renieri C, Antonini M, Lebboroni G. Llama meat nutritional properties. Italian J Anim Sci. 2007. 6(1): 857-858.
 143. Pérez P, Maino M, Guzmán R, Vaquero A, Köbrich C, Pokniak J. Carcass characteristics of llamas (*Lama glama*) reared in Central Chile. Small Ruminant Research. 2000. 37(1): 93-97.
 144. Sañudo C, Muela E. Caracterización de la carne por medio de análisis sensorial: Aspectos básicos. En: Introducción a la Ciencia de la Carne. Montevideo, Uruguay: Editorial Hemisferio Sur. 2010.

145. Forrest J.C, Aberle E.D, Hedrick H.B, Judge M.D, Merkel R.A .Fundamentos de ciencia de la carne. Zaragoza, España: Editorial Acribia.1979.
146. Moreno B. Higiene e inspección de Carne. Madrid, España:Editorial Díaz de Santos. 2006
147. Jeremiah E. Packaging alternatives of fresh meats using short or long term distribution. Food Res Int. 2001; 34(9):749-772.
148. Auqui S. Estrategias productivas y alimentarias para mejorar la calidad de la canal y de la carne de Chato Murciano [Tesis Ph. D]. 2014. Universidad de Murcia. España.
149. Antonio J, Martínez M, Vicario I, Heredia F. Correlation between visual and instrumental colour measurements of orange juice dilutions: effect of the background. Food Quality and preference.2005; 16(5):471-478.
150. Hedrick W, Parker M, Lee R. Using microsatellite and MHC variation to identify species, ESUs, and MUs in the endangered Sonoran topminnow. Mol. Ecol. 2001; 10 (6):1399-1412.
151. Tan W, Shelef A. Effects of sodium chloride and lactates on chemical and microbiological changes in refrigerated and frozen fresh ground pork. Meat Sci. 2002; 62(1):27-32.
152. Gonzales M, Mesa C, Quintero O. Estimating shelf life on beef and pork meat with different fat content. Vitae 2014; 21(3):201-210.

IX. ANEXOS

ANEXO N°1: Recolección de los frutos de mullak'a en el Centro Poblado Conin, distrito de Ponto, Provincia de Huari, departamento de Ancash.



ANEXO N°2: Carta de permiso de la municipalidad del Centro Poblado de Conin para la recolección de los frutos de mullak'a.

Conin 17. de abril del 2018

Señora
Ing. Eliana Contreras López
Docente UNMSM

Yo, Portugal Tolentino Verde, con DNI No. 72282906, en mi calidad de Alcalde de Centro Poblado de Conin, por este medio doy mi autorización a las Srtas. Ruth Hilaria Chavez Cerna con DNI 46827501 y Maria Alessandra Arosena Chao con DNI 71410823, para que colecten el fruto de mullak'a que crece en nuestra jurisdicción con fines de investigación.

En virtud de lo anterior, se les otorga este documento en señal de consentimiento para la colección del fruto.

Atentamente,



Portugal Tolentino Verde
Alcalde de Centro Poblado de Conin-Pontò

ANEXO N°3: Constancia de clasificación taxonómica de la planta mullak'a



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA N° 265-USM-2017

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (ramas floridas) recibida de **María Alessandra AROSEMA CHAO**, estudiante de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; sido estudiada y clasificada como: ***Muehlenbeckia volcanica*** (Benth.) Endl.; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: CARYOPHYLLIDAE

ORDEN: POLYGONALES

FAMILIA: POLYGONACEAE

GENERO: *Muehlenbeckia*

ESPECIE: *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl.

Nombre vulgar: "mullaca"
Determinado por Mag. Asunción A. Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 06 de Noviembre de 2017



Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)




ACE/ddb


ANEXO N°4: Medición del diámetro y peso promedio por unidad de fruto de mullak'a



ANEXO N°5: Composición proximal y cuantificación de calcio, hierro y potasio de la muestra de frutos de mullak'a.



LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos



INFORME DE ENSAYOS
N° 003892-2018

SOLICITANTE	: UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
DIRECCIÓN LEGAL	: CAL. GERMAN AMEZAGA NRO. 375 OTROS LIMA - LIMA - LIMA
	RUC : 20148092282 Teléfono : 3283236
PRODUCTO	: MULLACA (Muehlenbeckia volcanica)
NUMERO DE MUESTRAS	: Uno
IDENTIFICACIÓN/MTRA	: S.I.
CANTIDAD RECIBIDA	: 389,1 g (+envase) de muestra proporcionada por el solicitante.
MARCA(S)	: S.M.
FORMA DE PRESENTACIÓN	: Envasado, la muestra ingresa en bolsa cerrada.
SOLICITUD DE SERVICIOS	: S/S N°EN- 002020-2018
REFERENCIA	: PERSONAL
FECHA DE RECEPCIÓN	: 20/04/2018
ENSAYOS SOLICITADOS	: FÍSICO / QUÍMICO
PERÍODO DE CUSTODIA	: No aplica

RESULTADOS:

ENSAYOS FÍSICOS / QUÍMICOS:

LCANCE: N.A.

ENSAYOS	PROMEDIO	RESULTADO 1	RESULTADO 2
1.- Cenizas Totales (g/100 g de muestra original)	0,9	0,91	0,90
2.- Grasa Cruda (g/100g de muestra original)	0,3	0,26	0,28
3.- Humedad (g/100 g de muestra original)	80,5	80,48	80,52
4.- Proteína Cruda (g/100 g de muestra original)(Factor: 6,25)	4,4	4,43	4,40
5.- Carbohidratos (g/100 g de muestra original)	13,9	---	---
6.- Energía Total (Kcal/100 g de muestra original)	75,9	---	---
7.- % Kcal. proveniente de Carbohidratos	73,2	---	---
8.- % Kcal. proveniente de Grasa	3,6	---	---
9.- % Kcal. proveniente de Proteínas	23,2	---	---
10.- Calcio (mg/100 g de muestra original)	43,1	43,10	43,12
11.- Hierro (mg/100 g de muestra original)	6,4	6,32	6,41
12.- Potasio (mg/100 g de muestra original)	280,3	280,3	280,3
13.- Vitamina C (mg/100 g de muestra original)	36,8	36,78	36,78

MÉTODOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO:

- 1.- AOAC 940.26(A) Cap. 37, Pág. 7, 20th Edition 2016
- 2.- AOAC 905.02 Cap. 33, Pág. 19, 20th Edition 2016
- 3.- AOAC 920.151 Cap. 37, Pág. 6, 20th Edition 2016
- 4.- AOAC 920.152 Cap. 37, Pág.10, 20th Edition 2016
- 5.- Por Diferencia MS-INN Collazos 1993
- 6.- Por Cálculo MS-INN Collazos 1993
- 7.- Por Cálculo MS-INN Collazos 1993
- 8.- Por Cálculo MS-INN Collazos 1993
- 9.- Por Cálculo MS-INN Collazos 1993
- 10.- AOAC 975.03 Cap. 3, Pág. 5-6, 20th Edition 2016
- 11.- AOAC 975.03 Cap. 3, Pág. 5-6, 20th Edition 2016
- 12.- AOAC 975.03 Cap. 3, Pág. 5-6, 20th Edition 2016
- 13.- AOAC 967.21 Cap. 45, Pág. 21-22, 20th Edition 201

CONTINUA INFORME DE ENSAYOS N° 003892-2018

Pág. 1/2

Av. La Molina S/N (frente a la puerta principal de la Universidad Agraria) - La Molina - Lima - Perú

Telf.: (511) 3495640 - 3492507 Fax: (511) 3495794

E-mail: mktg@lamolina.edu.pe - Página Web: www.lamolina.edu.pe/calidadtotal - la molina calidad total

ANEXO N°6: Determinación de los grados Brix, pH y acidez de los frutos de mullak'a.



DETERMINACIÓN DE GRADOS BRIX



DETERMINACIÓN DE PH



DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ:
TITULACIÓN HASTA UN PH DE 8.1

ANEXO N°7: Marcha fotoquímica de los frutos de mullak'a



Identificación de Alcaloides

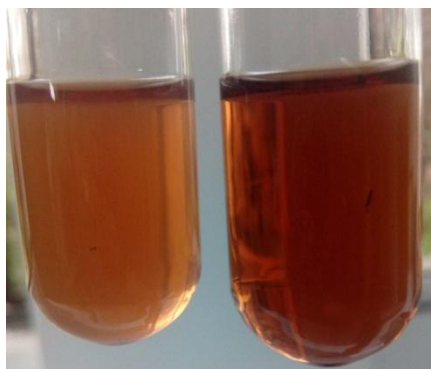
TUBO 1: Etanol al 80% + Reactivo + HCl

TUBO 2: Extracto + HCl

TUBO 3: Muestra + Reactivo

TUBO 4: Muestra + Reactivo + HCl

REACCIÓN NEGATIVA



Identificación de taninos:

TUBO 1: Muestra + Gelatina 1%

TUBO 2: Blanco de reacción

REACCIÓN NEGATIVA



Identificación de Flavonoides:

TUBO 1: Blanco de reacción

TUBO 2: Muestra + Reactivo

REACCIÓN POSITIVA



**Identificación de Azúcares
Reductores:**

Muestra + Felhing A + Felhing
B

REACCIÓN POSITIVA



**Identificación de
saponinas:**

Muestra + Agua destilada

REACCIÓN NEGATIVA



**Identificación de
Antocianinas:**

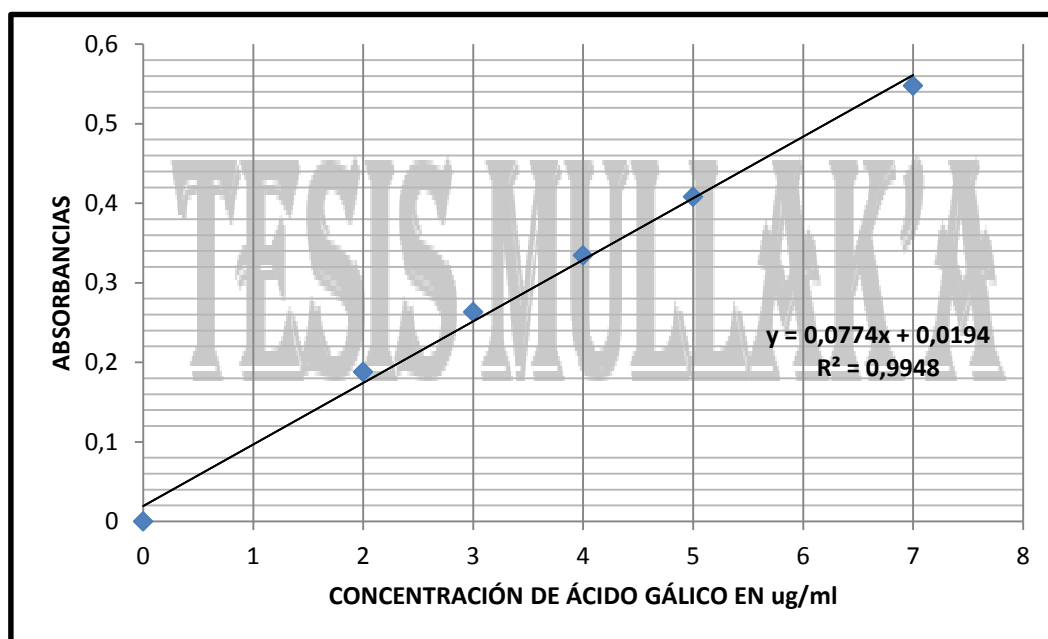
TUBO 1: Muestra + NaOH

TUBO 2: Muestra + HCl

REACCIÓN POSITIVA

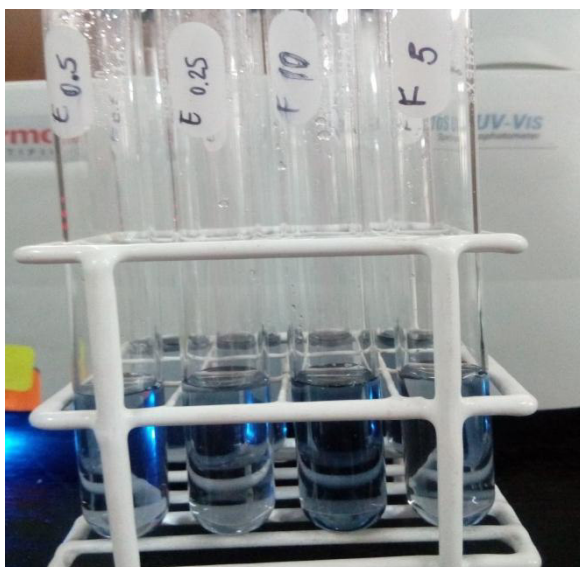
ANEXO N°8: Determinación de polifenoles totales

Curva de calibración para polifenoles



Realización de la curva de calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles totales.





Determinación de polifenoles
totales:

TUBO 1: Extracto a 0.5 mg/ml

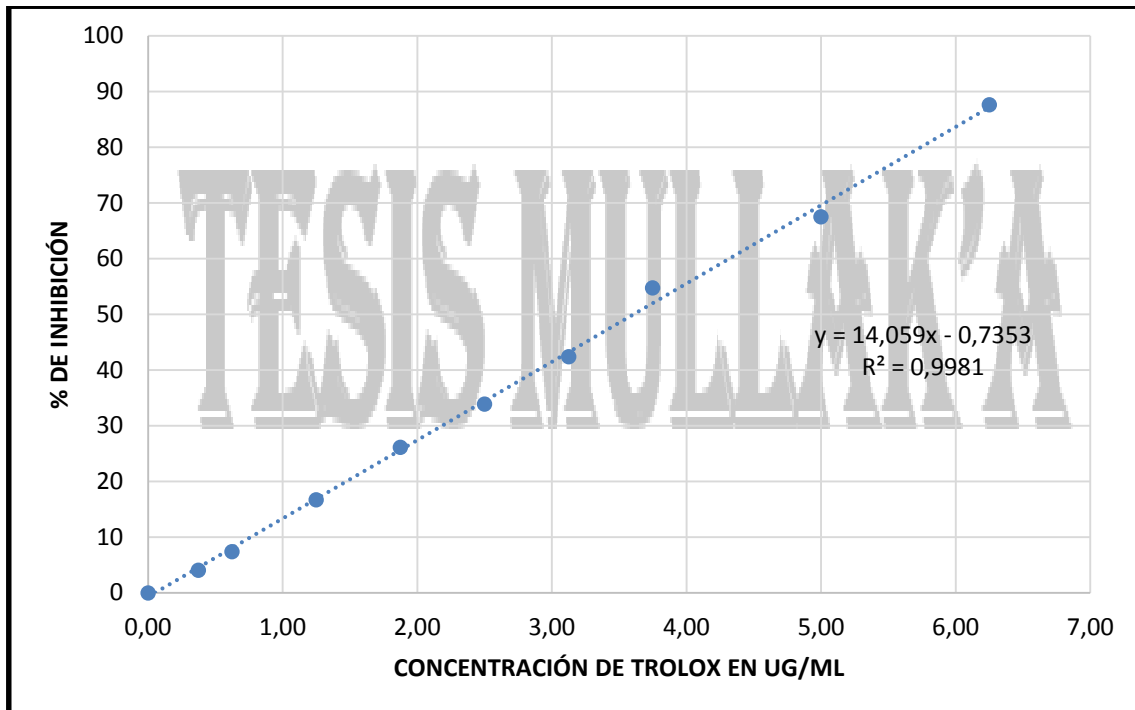
TUBO 2: Extracto a 0.25 mg/ml

TUBO 3: FRUTO a 10 mg/ml

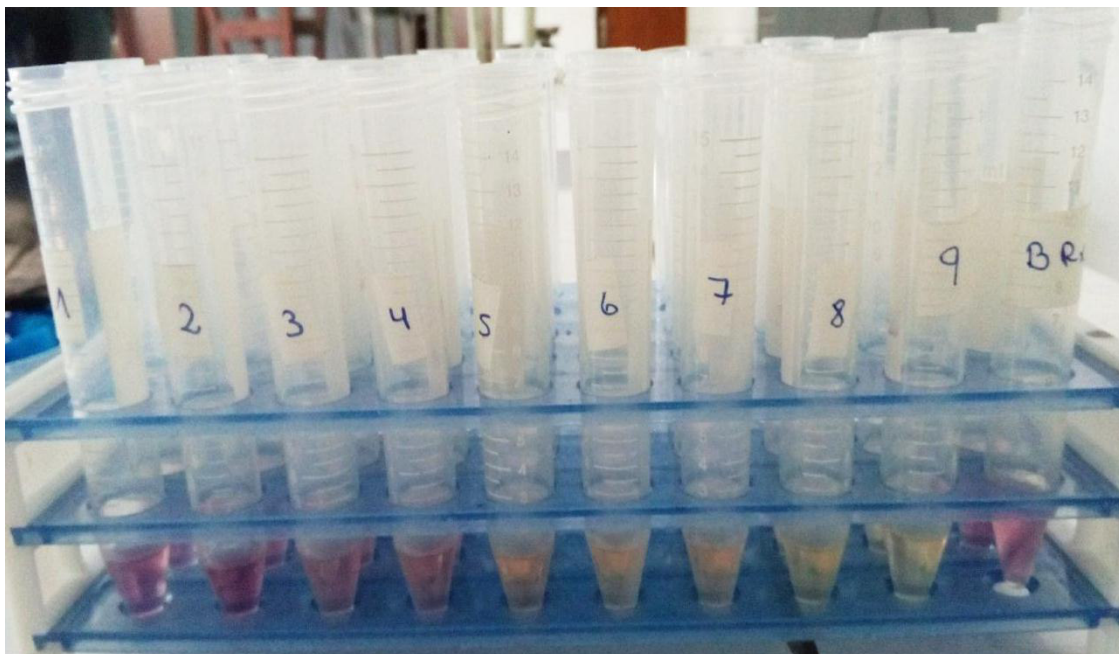
TUBO 4: FRUTO a 5 mg/ml

ANEXO N°9: Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH.

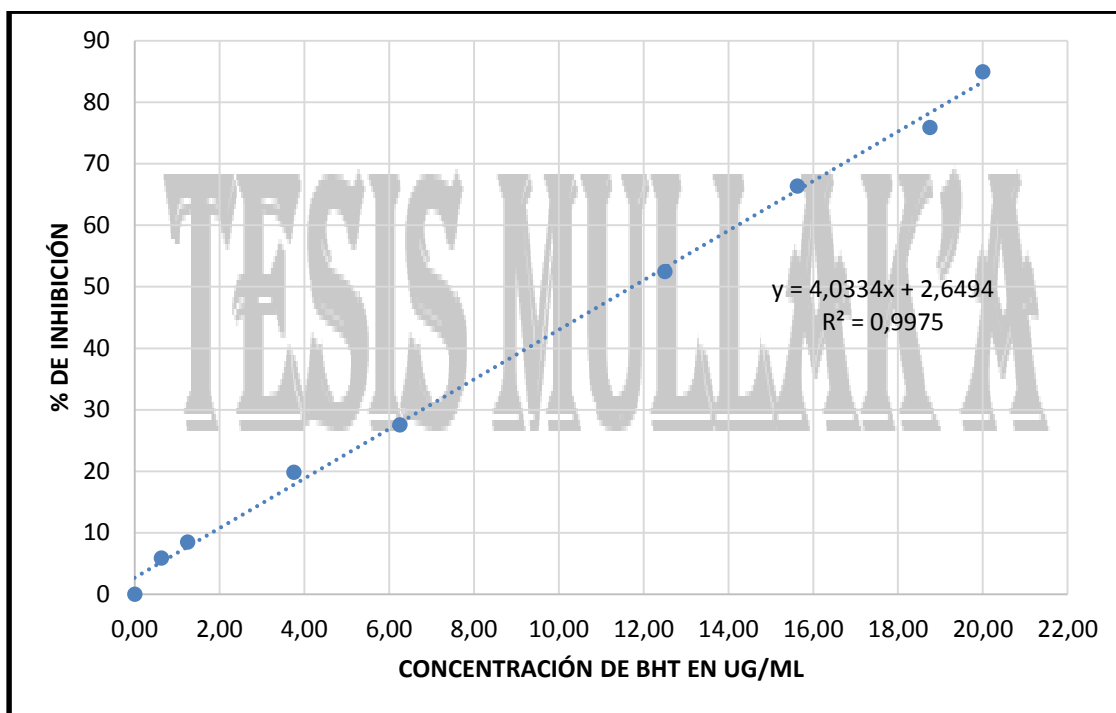
Curva de calibración del TROLOX para DPPH



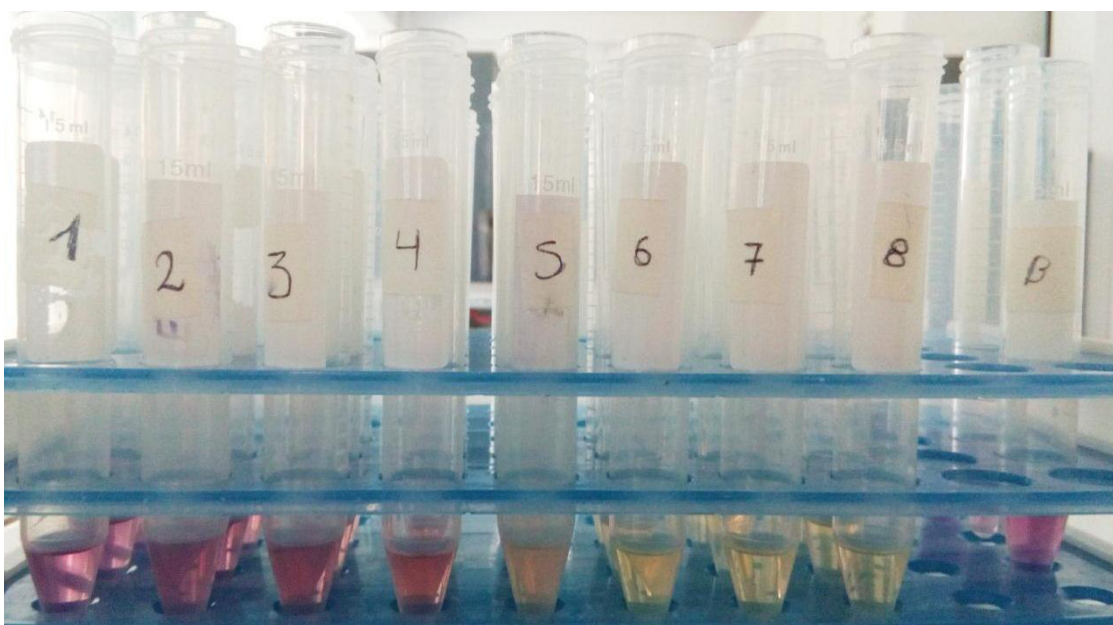
Realización de la curva de calibración de TROLOX para la determinación de capacidad antioxidante, mediante método DPPH



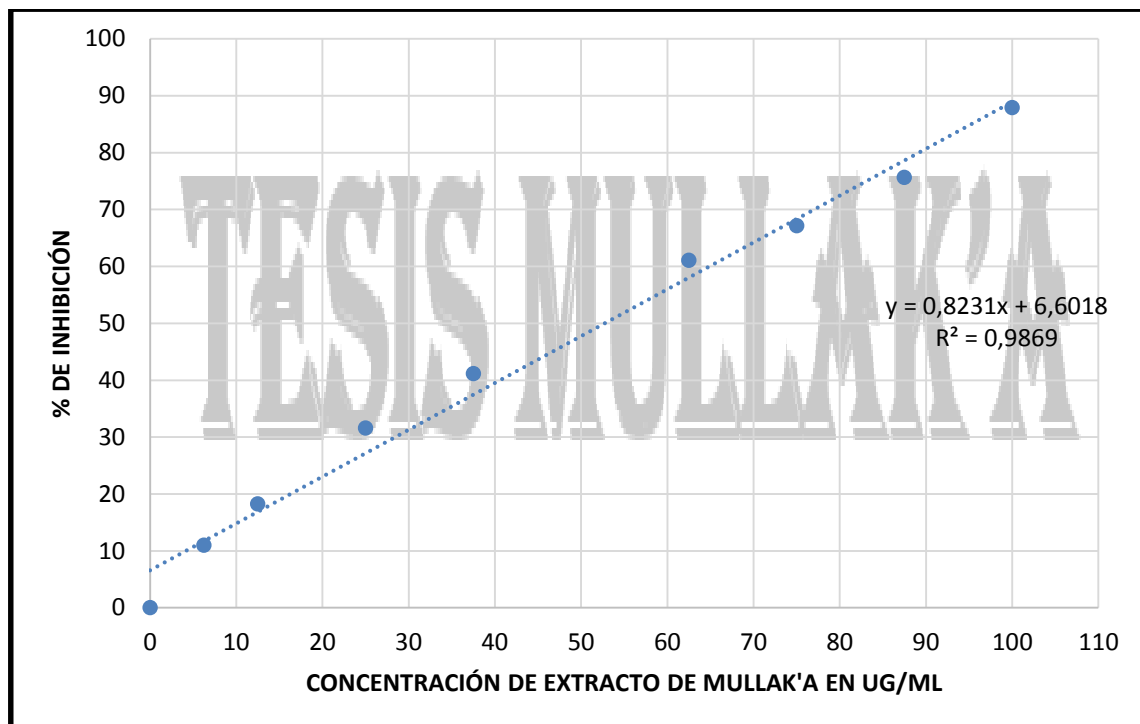
Curva de calibración del BHT para DPPH



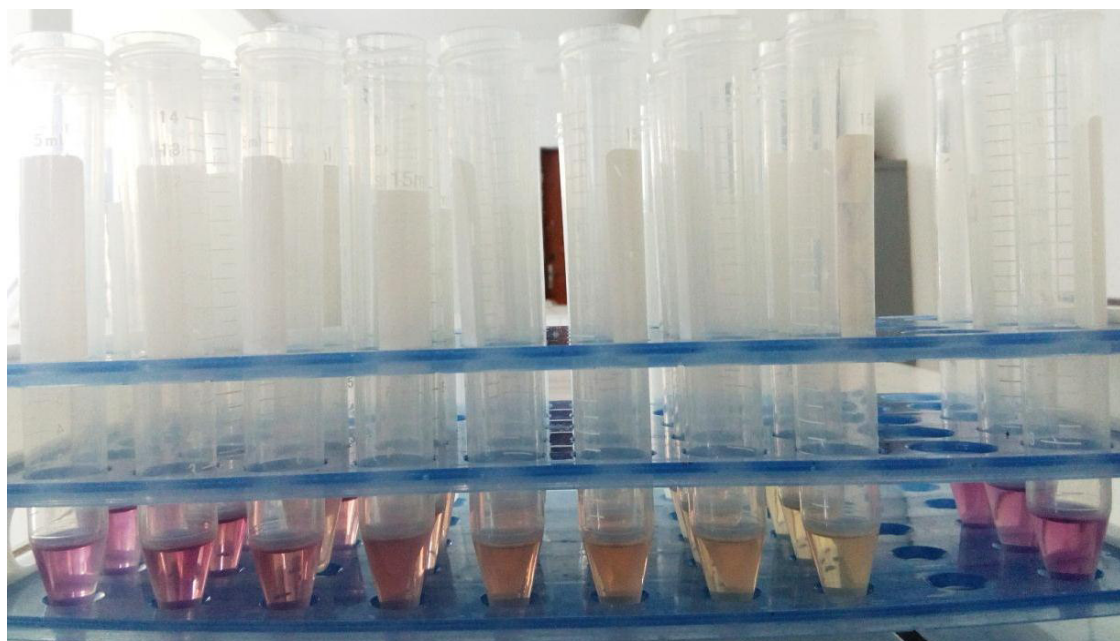
Realización de la curva de calibración de BHT para la determinación de capacidad antioxidante, mediante método DPPH



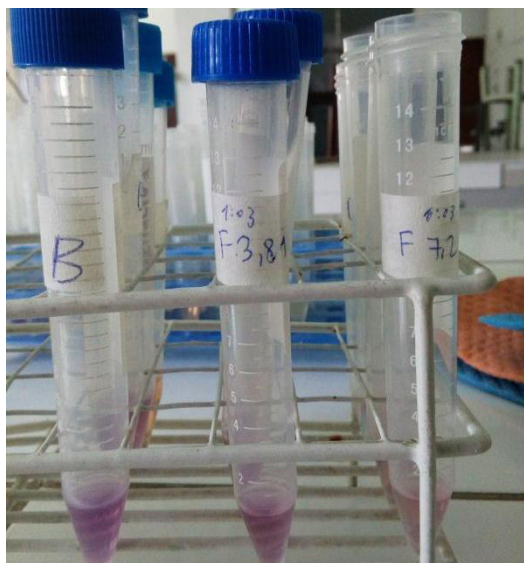
Curva de calibración del extracto de mullak'a para DPPH



Realización de la curva de calibración del extracto de frutos de mullak'a para la determinación de capacidad antioxidante, mediante método DPPH



Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH en Muestras de fruto de mullak'a



TUBO 1:

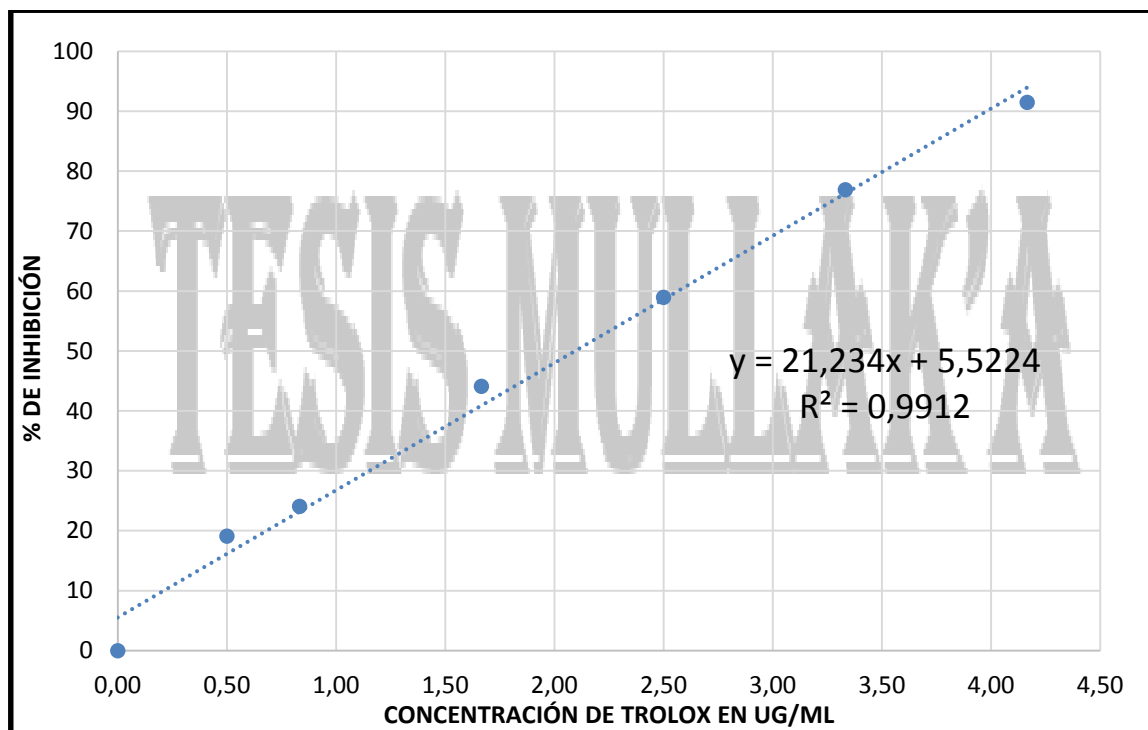
Muestra de fruto 3.8 mg/ml

TUBO 2:

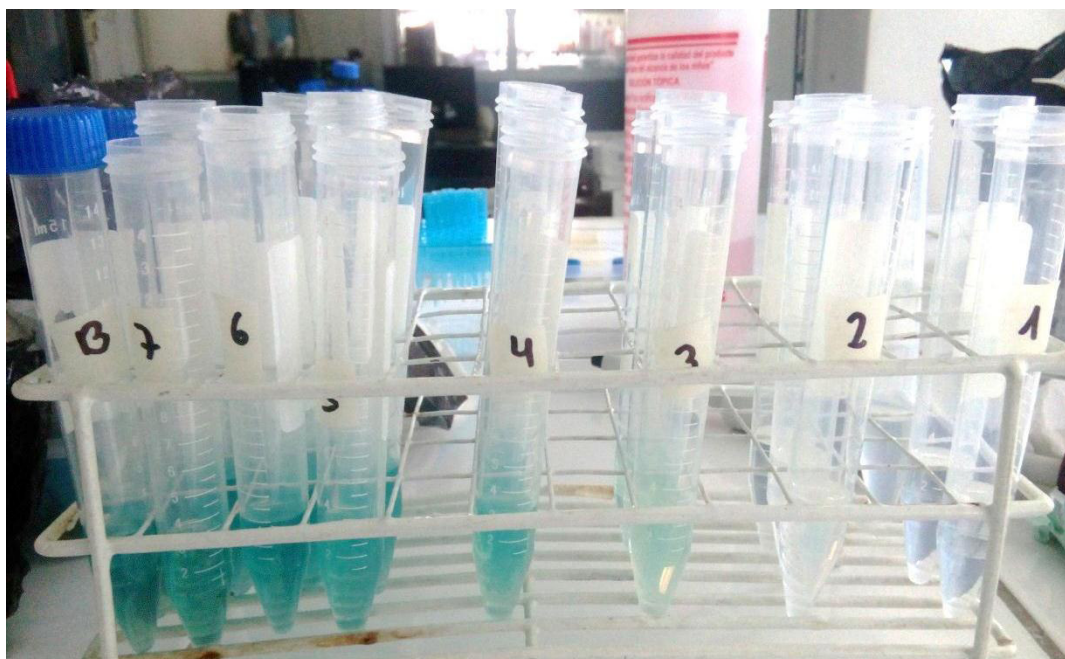
Muestra de fruto 7.6 mg/ml

ANEXO N°10: Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS

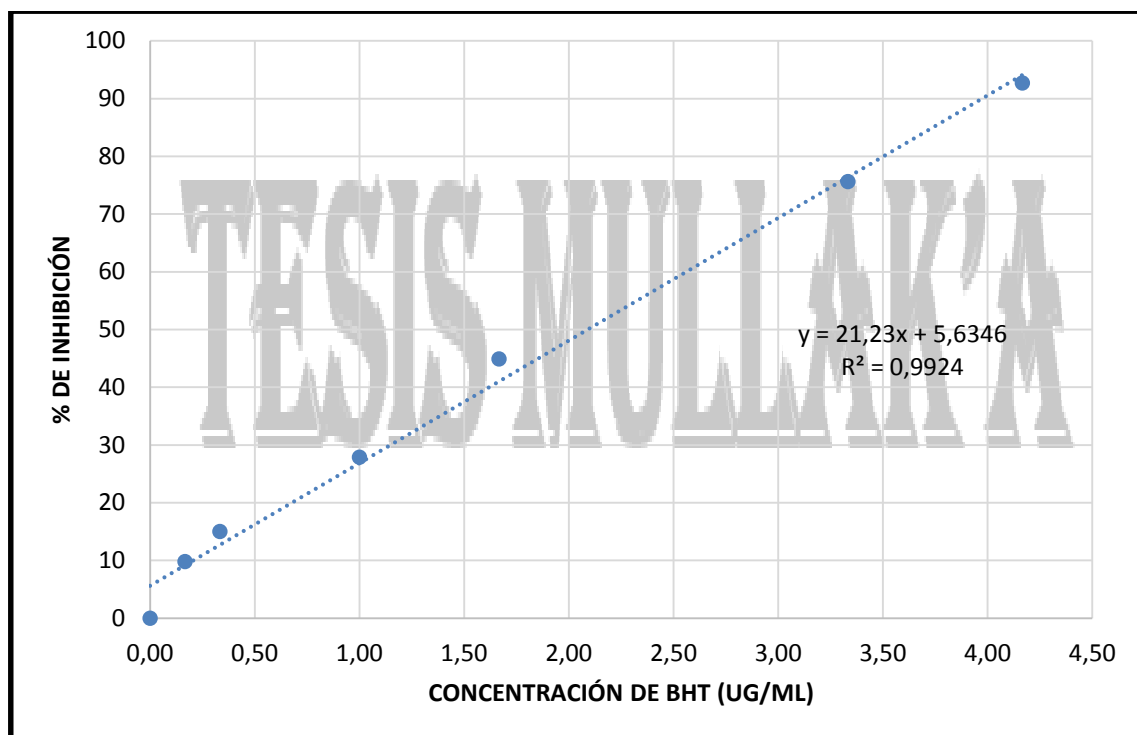
Curva de calibración del TROLOX para ABTS



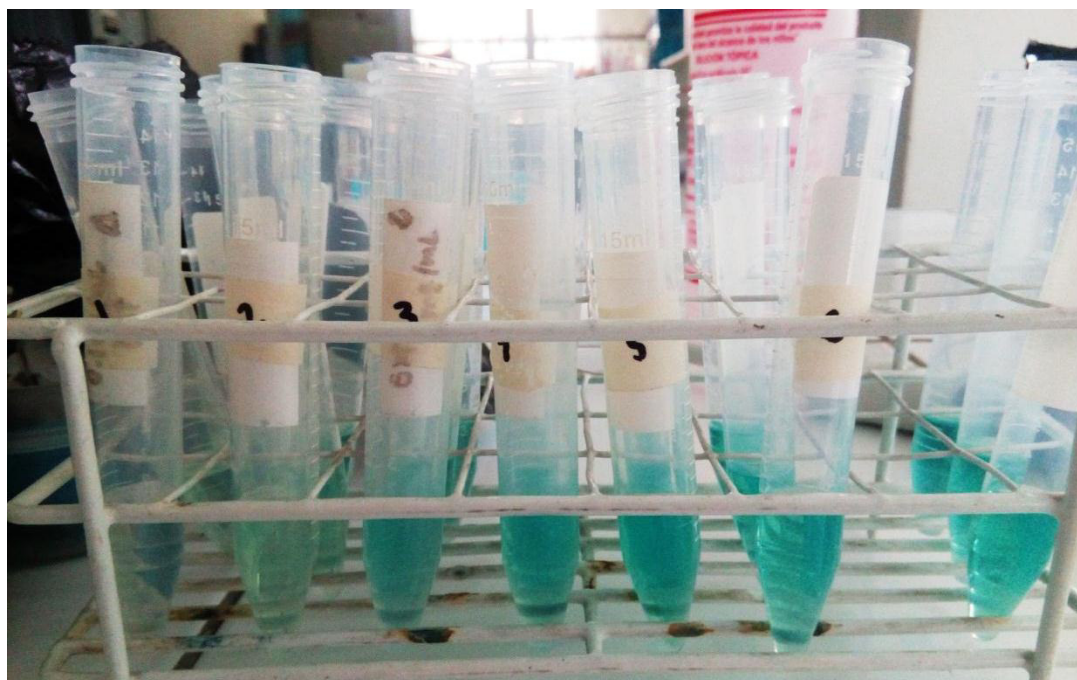
Realización de la curva de calibración de TROLOX para la determinación de capacidad antioxidante, mediante método ABTS



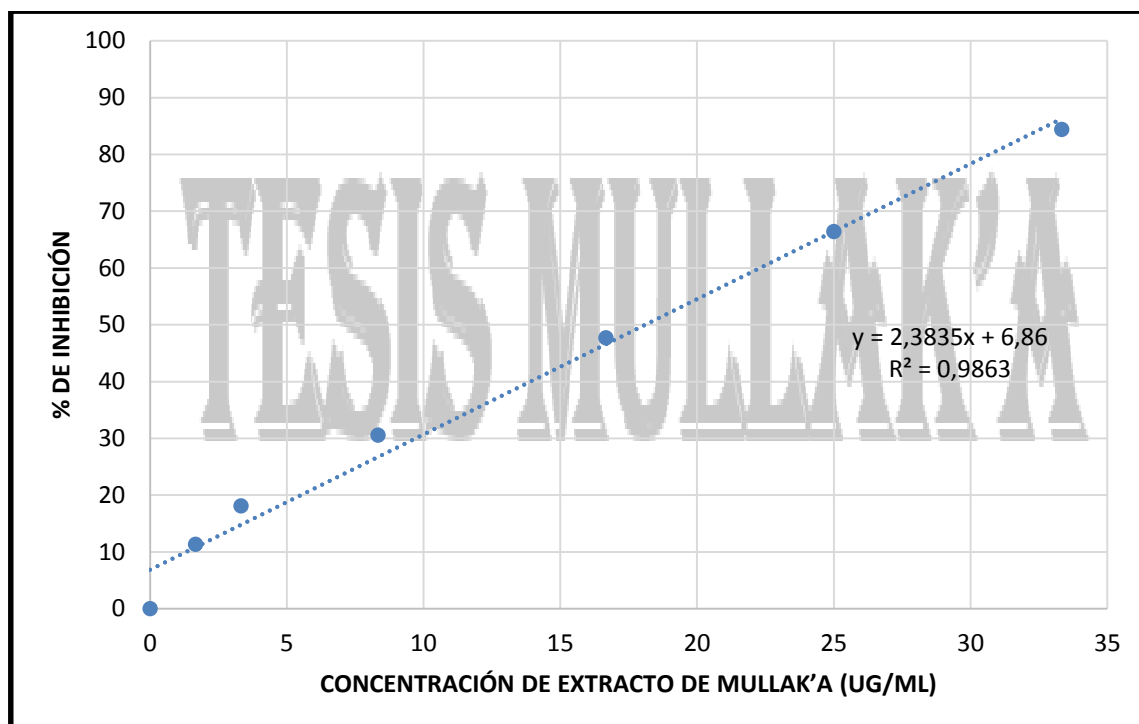
Curva de calibración del BHT para ABTS



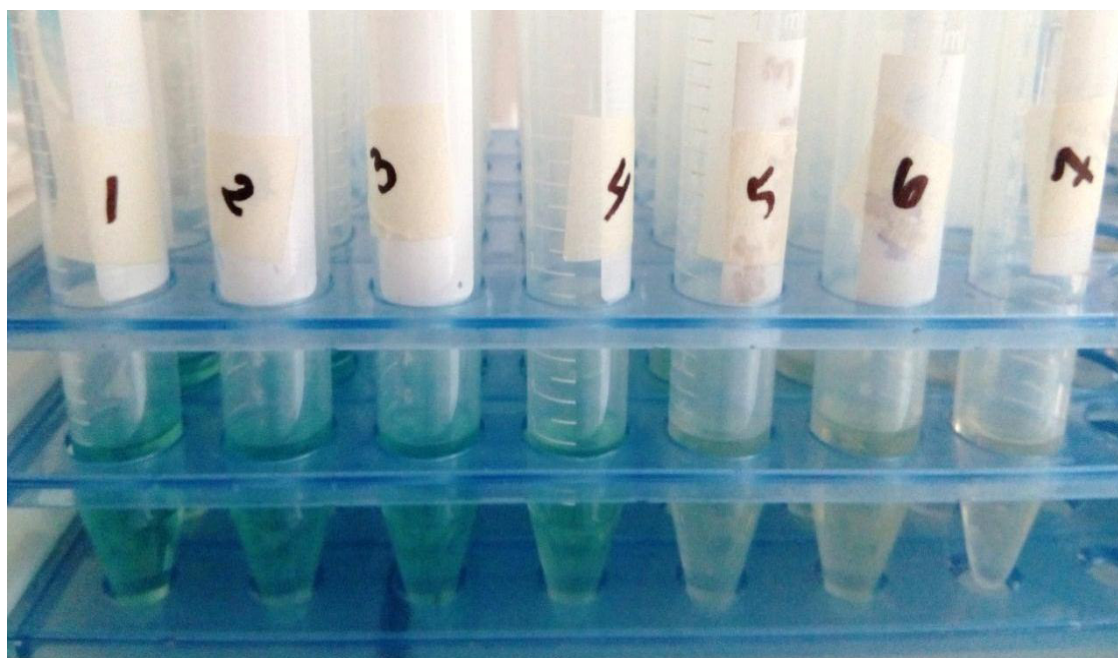
Realización de la curva de calibración de BHT para la determinación de capacidad antioxidante, mediante método ABTS



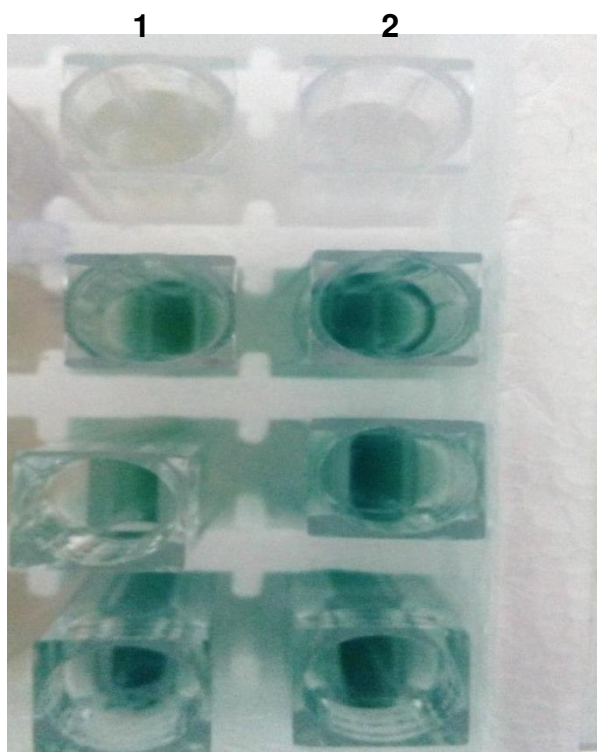
Curva de calibración del extracto de mullak'a para ABTS



Realización de la curva de calibración del extracto de frutos de mullak'a para la determinación de capacidad antioxidante, mediante método ABTS



Determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS en Muestras de fruto de mullak'a



1: Muestra de fruto 15.2 mg/ml

2: Muestra de fruto 7.6 mg/ml

ANEXO N°11: Evaluación de los parámetros de calidad de la carne de alpaca



Evaluación del CRA de la muestra de carne de alpaca



Determinación de la humedad de la muestra de carne de alpaca



Preparación de las muestras de carne de alpaca para la medición de pH



Determinación del pH de la muestra de carne de alpaca

ANEXO N°12: Acondicionamiento de la carne de alpaca para la muestra control y los dos tratamientos

Cálculos de equivalencia y capacidad antioxidante, según Fernandes et. al, 2017

	IC₅₀ Extracto de mullak'a (µg/ml)	IC₅₀ BHT (µg/ml)
DPPH	52.7	11.7
ABTS	18.1	2.1
Equivalencia	DPPH: 4.50 ABTS: 8.62	1
Equivalencia (ppm)	DPPH: 450 ABTS: 862	100 ppm (según Codex Alimentario)



Carne de alpaca empacada al vacío



Medición de la temperatura de la carne de alpaca



Retiro del tejido conectivo de la carne de alpaca



Molienda de la carne de alpaca



Adición del BHT a la carne de alpaca



Adición del extracto de frutos de Mullak'a a la carne de alpaca



Empacado de la carne de alpaca en platos de poliestireno expandido y envueltos con film de uso alimentario

ANEXO Nº13: Muestras de carne de los cinco tiempos y de los diferentes tratamientos

Muestras de carne de alpaca control en los cinco tiempos



Muestras de carne de alpaca con extracto de frutos de mullak'a en los cinco tiempos



Muestras de carne de alpaca con BHT en los cinco tiempos



ANEXO Nº14: Evaluación sensorial

Ficha de Evaluación Sensorial para las pruebas triangulares

FICHA DE EVALUACIÓN SENSORIAL-T1

NOMBRE: _____ FECHA: _____

INSTRUCCIONES. - Frente a usted hay tres muestras, dos de ellas son idénticas y la otra diferente. Pruebe las muestras en el orden indicado e identifique la muestra diferente

a) Gaseosa Negra

MUESTRAS			¿CUAL ES LA DIFERENTE?
042	297	624	

b) Gaseosa Anaranjada

MUESTRAS			¿CUAL ES LA DIFERENTE?
128	339	970	

c) Gaseosa Amarilla

MUESTRAS			¿CUAL ES LA DIFERENTE?
857	641	431	

Comentarios:

.....

¡Gracias por su participación!



Muestras utilizadas para las pruebas triangulares

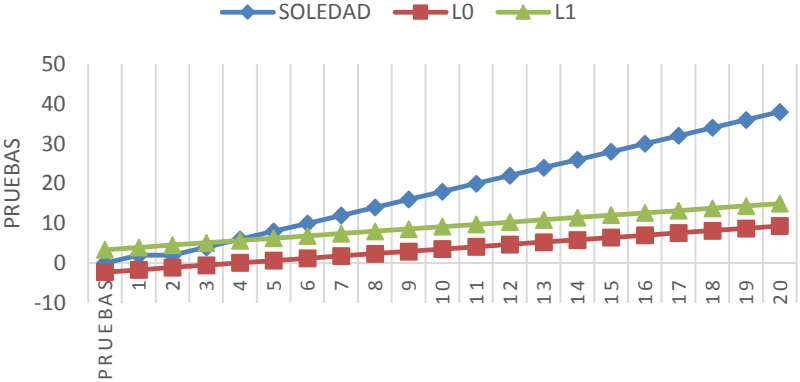
Numero de prueba triangular	Muestra utilizada
1	gaseosa negra
2	gaseosa anaranjada
3	gaseosa amarilla
4	gaseosa blanca
5	néctar de durazno
6	jugo de naranja
7	wafers
8	té verde
9	gaseosa roja
10	galleta de vainilla
11	galleta salada
12	gaseosa de piña
13	mantequilla
14	néctar de pera
15	panetón
16	galleta de chocolate
17	galleta integral
18	bebida energizante sabor fresa
19	hot dog de pollo
20	Jamonada de cerdo
21	leche chocolatada

Resultados de las pruebas discriminatorias triangulares

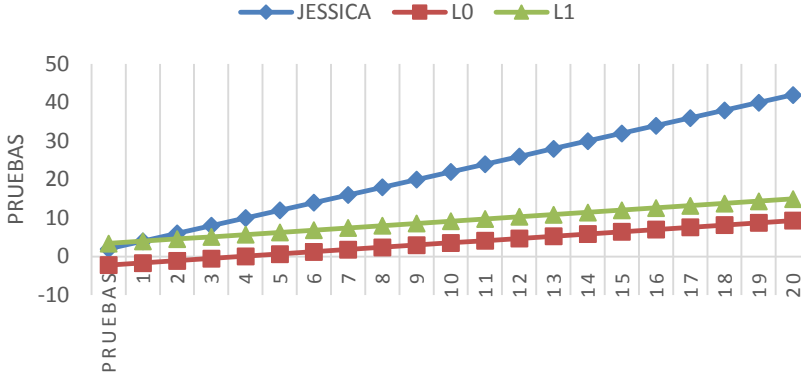
	SOLEDAD	JESSICA	MARY	CINTHIA	STEPHANY	SOLANGE	PAOLA	JHANIN	MARIA	ISMAEL	RENZO	NATALIA	ERIKA	WENDY	BELEN	PAULA
Pruebas	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje	puntaje
1	0	2	2	2	0	2	2	0	2	2	2	0	2	2	0	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	0
3	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2
4	2	2	2	2	2	2	0	2	0	2	0	0	2	0	0	0
5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
8	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
9	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
10	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
11	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
12	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
13	2	2	2	2	2	2	2	0	0	2	2	2	0	2	2	2
14	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
15	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2
16	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
18	2	2	2	2	2	2	2	0	0	2	2	2	2	2	2	2
19	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2
20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2
21	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2
% de aciertos	90.48	100.00	100.00	95.24	90.48	100.00	85.71	85.71	80.95	95.24	95.24	76.19	95.24	90.48	90.48	76.19

Prueba de secuencial de Wald

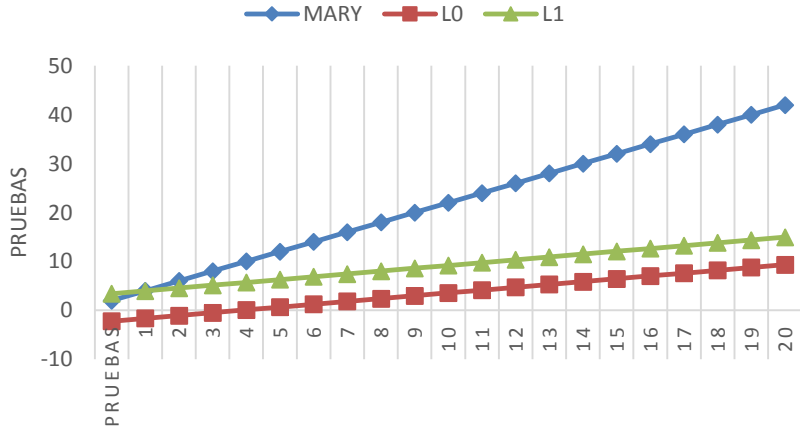
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



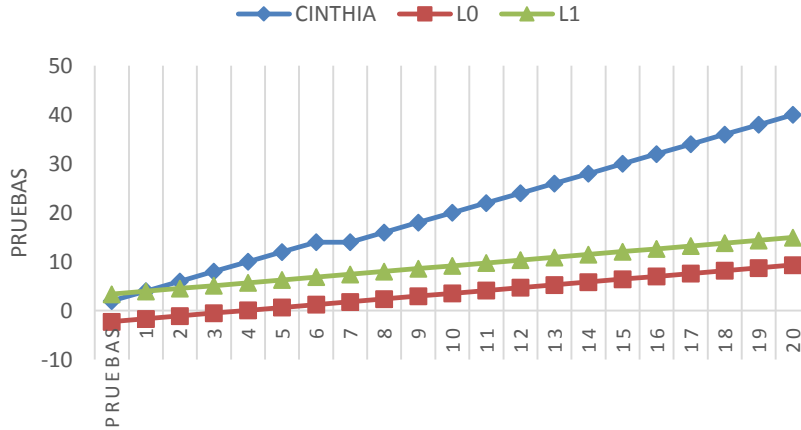
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



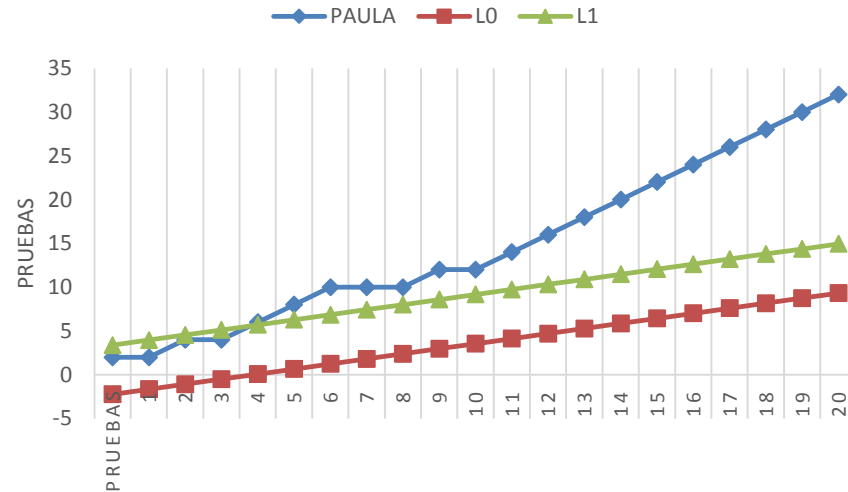
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



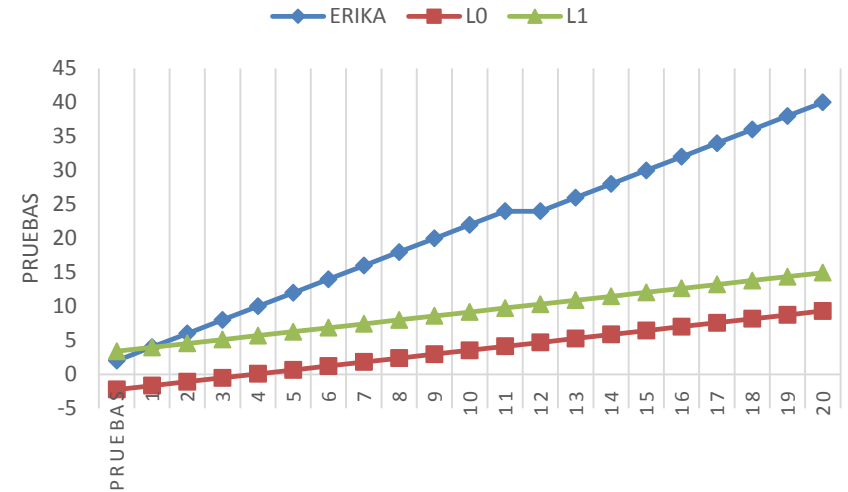
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



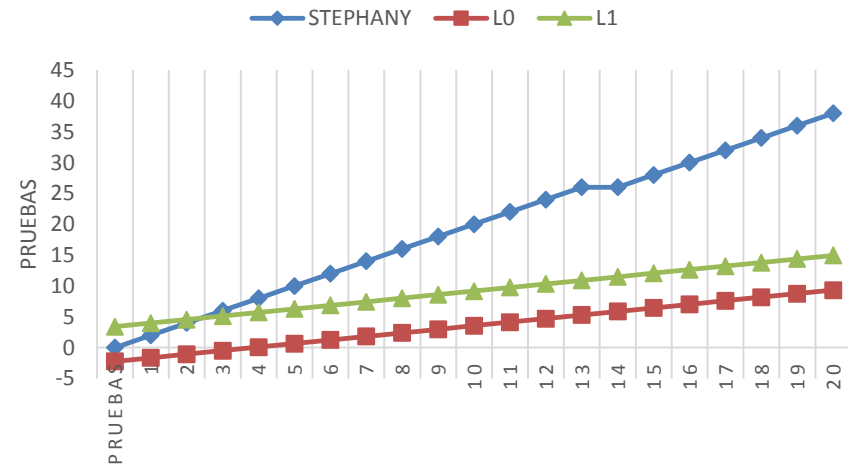
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



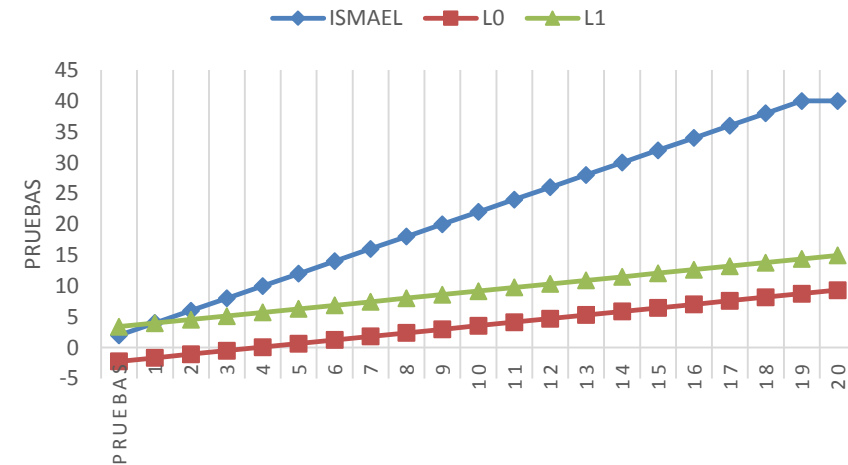
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



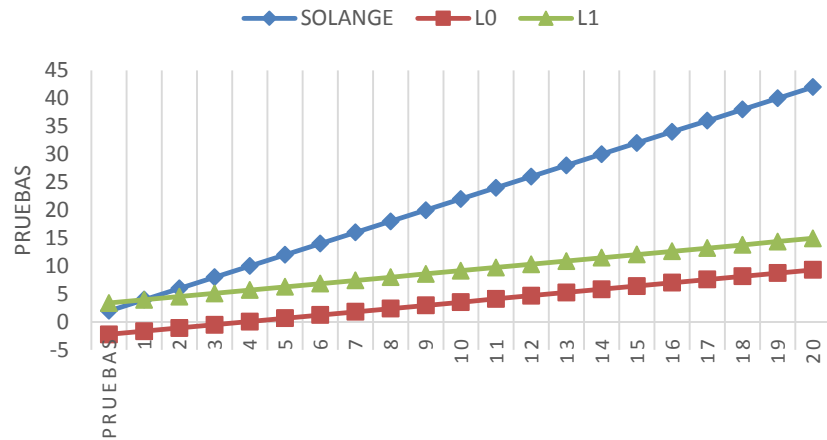
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



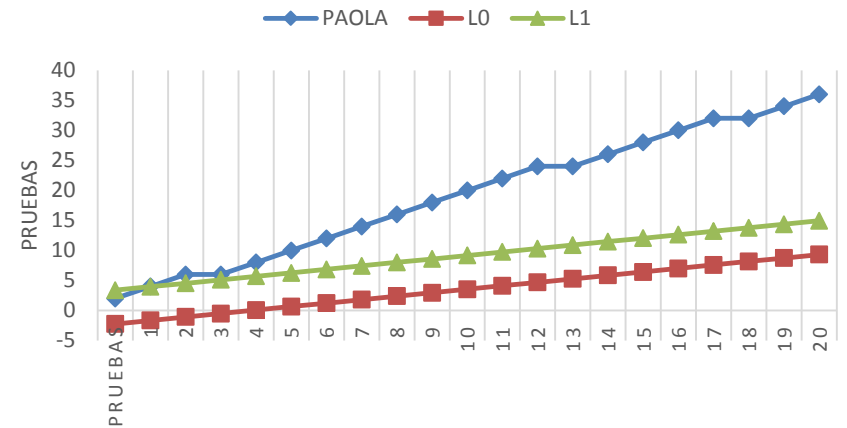
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



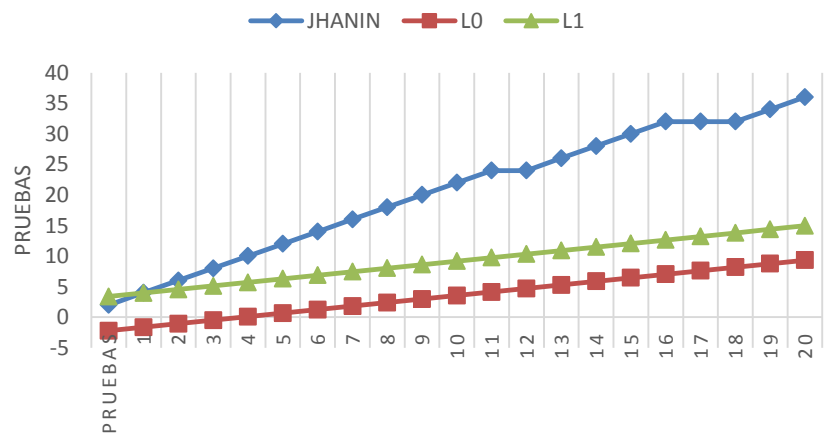
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



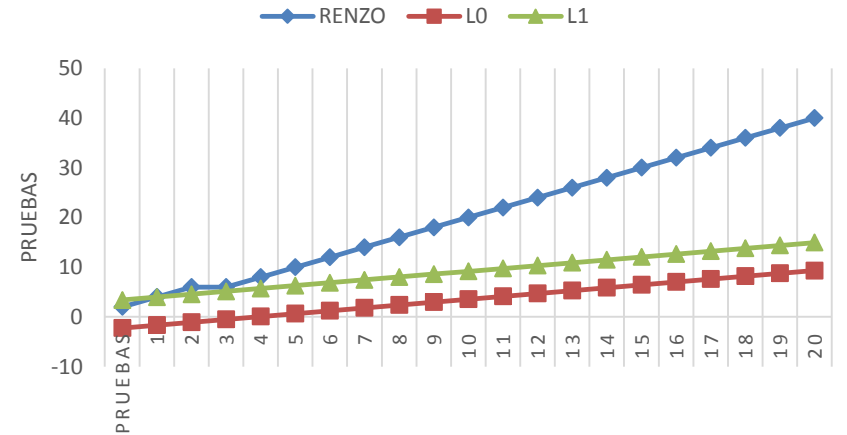
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



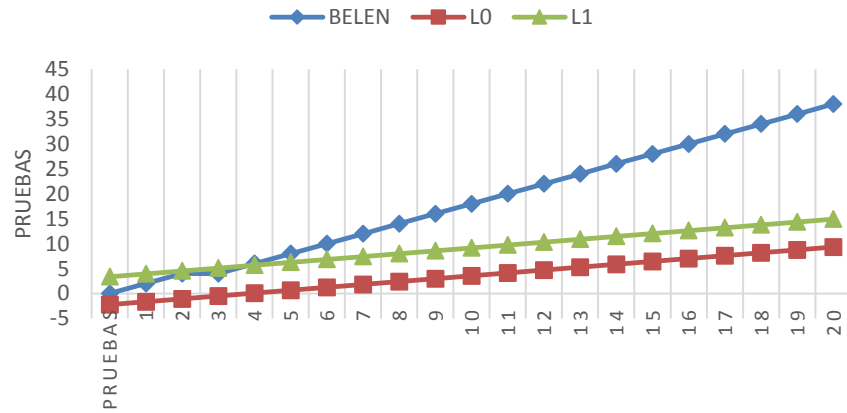
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



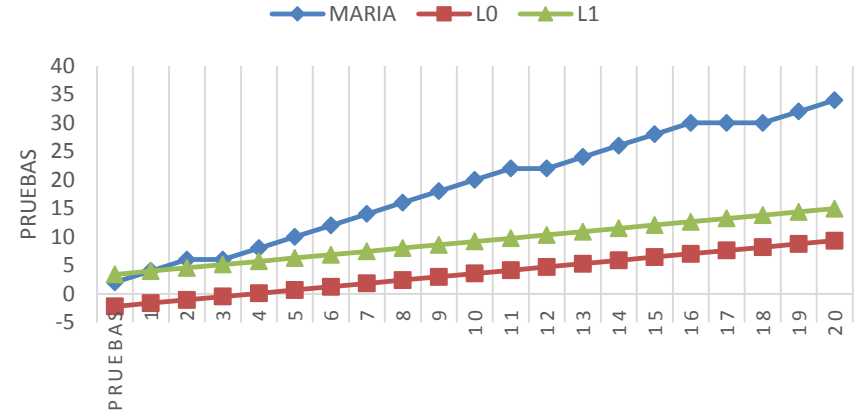
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



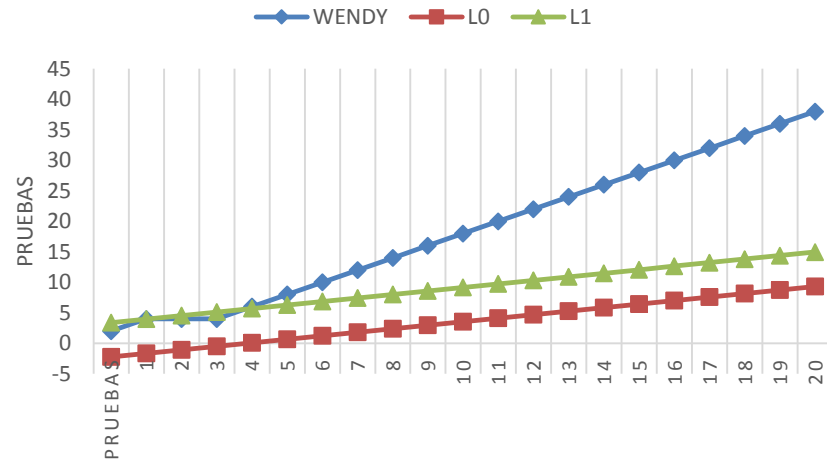
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



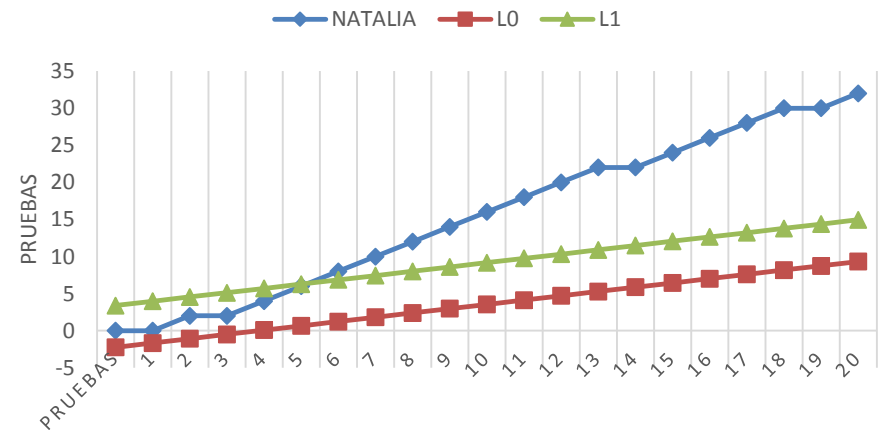
PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



PRUEBA SECUENCIAL DE WALD



PRUEBA SECUENCIAL DE WALD





Prueba de olores



Pruebas triangulares



Pruebas triangulares



Entrenamiento de los panelistas

Ficha de evaluación sensorial utilizada para las muestras de carne de alpaca con los tratamientos, en almacenamiento refrigerado

FICHA DE EVALUACIÓN SENSORIAL

MUESTRA: _____

NOMBRE: _____ FECHA: _____

INDICACIONES: Coloque una línea vertical en el punto que crea usted corresponde a la magnitud del atributo evaluado. Evaluar los atributos en el orden de aparición.

ASPECTO GENERAL



COLOR



CONSISTENCIA



OLOR



MUCHAS GRACIAS POR
TU PARTICIPACIÓN



Evaluación sensorial de las muestras de carne de alpaca



ANEXO N°15: Análisis microbiológico de las muestras de carne de alpaca para los cinco tiempos



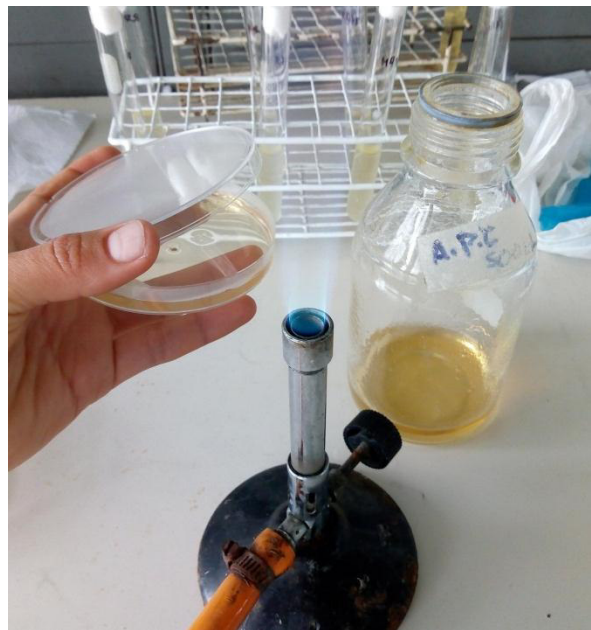
Pesaje de la muestra a analizar



Dilución de las muestras en agua peptonada



Realización de las diluciones



Siembra en placa por inmersión